

Funktionelle Rolle und subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen 1 und 2 in HEK-293- und PC12-Zellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr.rer.nat.

des Fachbereiches

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Kerstin Danneberg

aus Düsseldorf

Oktober 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen, durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. K. H. Jakobs
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. G. Obe

Tag der mündlichen Prüfung: 11.2.04

Für Tristan

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen.....	1
2.	Einleitung.....	3
2.1.	Extrazelluläre Wirkung von S1P.....	3
2.2.	Intrazelluläre Wirkung von S1P.....	4
2.3.	Sphingosinkinasen.....	4
2.4.	Zielsetzung.....	7
3.	Material und Methoden.....	9
3.1.	Material.....	9
3.1.1.	Chemikalien.....	9
3.1.2.	Radioaktive Chemikalien.....	11
3.1.3.	Antikörper.....	11
3.1.4.	Restriktionsenzyme.....	12
3.1.5.	Vektoren.....	12
3.1.6.	DNS-Konstrukte.....	12
3.1.7.	<i>E.coli</i> Stämme.....	13
3.1.8.	Primer.....	13
3.1.9.	Sonstige Materialien.....	13
3.1.10.	Kits.....	14
3.2.	Methoden.....	15
3.2.1.	Zellkultur.....	15
3.2.2.	RNA-Präparation.....	15
3.2.3.	Reverse Transkription.....	16
3.2.4.	RT-PCR.....	16
3.2.5.	Gelelektrophorese.....	17
3.2.6.	Restriktion mit Restriktionsendonukleasen.....	17
3.2.7.	Elution von DNS aus Agarosegelen.....	18
3.2.8.	Dephosphorylierung des Vektors.....	18
3.2.9.	Ligation.....	18

3.2.10. Kompetente Bakterien.....	19
3.2.11. Agarplatten.....	19
3.2.12. Transformation kompetenter Bakterien und Präparation von Plasmid-DNS.....	19
3.2.13. Transfektion von Zellen mittels der Calciumphosphatmethode.....	20
3.2.14. Proteinbestimmung nach Bradford.....	21
3.2.15. Proteinbestimmung nach Pierce.....	21
3.2.16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot-Analyse.....	21
3.2.17. Bestimmung der S1P-Produktion.....	23
3.2.18. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration.....	23
3.2.19. Messung der Noradrenalin-Freisetzung.....	24
3.2.20. Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen in lebenden Zellen.....	26
3.2.21. Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen durch Immunfluoreszenz.....	26
3.2.22. Präsentation und statistische Auswertung der Messwerte.....	27
 4. Ergebnisse.....	 28
4.1. Noradrenalin-Freisetzung durch intrazelluläres S1P und Sphingosin in PC12-Zellen.....	 28
4.2. Klonierung und Expression einer SphK2-Variante.....	33
4.3. Einfluß von SphK1 und SphK2 auf $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung.....	 42
4.3.1. Einfluß von SphK1 und SphK2 auf $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen.....	42
4.3.2. Einfluß von SphK1 und SphK2 auf $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin- Freisetzung in PC12-Zellen.....	 45
4.4. Subzelluläre Lokalisation und Translokation der Sphingosinkinase-Isoformen.....	50
4.4.1. Subzelluläre Lokalisation und Translokation der Sphingosinkinase-Isoformen in HEK-293-Zellen.....	 50
4.4.2. Einfluß verschiedener Agonisten auf die subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen in HEK-293-Zellen.....	 51
4.4.3. Wirkung verschiedener Agonisten auf die Lokalisation der SphK1 in stabil den M ₂ -Muskarinrezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen.....	 57
4.4.4. Mechanismus der durch den M ₃ -Rezeptor induzierten SphK1-Translokation.....	58
4.4.5. G α_q -vermittelte Translokation der SphK1 zur Plasmamembran in HEK-293-Zellen.....	 65
4.4.6. Lokalisation der SphK1 vor und nach Stimulation mit Agonisten in PC12-Zellen.....	67

4.4.7.	Vergleich der Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen mit dem ER und dem Golgi-Apparat.....	69
5.	Diskussion.....	71
5.1.	Einfluß von Sphingolipiden auf die Noradrenalin-Freisetzung in permeabilisierten PC12-Zellen.....	71
5.2.	Klonierung einer SphK2-Variante.....	72
5.3.	Rolle der Sphingosinkinase-Isoformen bei der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung.....	73
5.4.	Lokalisation und Translokation der Sphingosinkinase-Isoformen in HEK-293- und PC12-Zellen.....	77
6.	Zusammenfassung.....	81
7.	Literaturverzeichnis.....	85
8.	Anhang.....	95

1. Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
bp	<i>base pair</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre freie Calciumkonzentration
cDNA	<i>copy DNA</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
DHS	DL- <i>threo</i> -Dihydrosphingosin
DMEM	<i>Dulbecco' s modified Eagle' s medium</i>
DMS	Dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleotidmix
DTT	Dithiothreitol
ECL [®]	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
fMLP	N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate conjugate</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G418	Geneticin [®]
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
HBSS	<i>Hanks' s balanced salt solution</i>
HeBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HL-60	Humane Leukämiezellen

IPTG	Isopropylthiogalactosid
LPA	Lysophosphatidsäure
NaAc	Natriumacetat
N1E115	Neuroblastomzellen
PC12	Phäochromocytomzellen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pol	Polymerase
PTX	Pertussistoxin
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>reverse transcriptase</i> PCR
S.D.	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des Endoplasmatischen Retikulums
SLO	Streptolysin O
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
SphK	Sphingosinkinase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TLC	<i>thin layer chromatography</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

2. Einleitung

Sphingosin-1-phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, welches als *first* und *second messenger* diverse biologische Prozesse innerhalb und außerhalb der Zelle reguliert (Hla, 2003; Pyne und Pyne, 2002; Spiegel und Milstien, 2002; 2003).

2.1. Extrazelluläre Wirkungen von S1P

Die meisten dieser Ereignisse wie Zellmigration, Proliferation, Morphogenese und Überleben beruhen auf der Interaktion von S1P mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (Fukushima *et al.*, 2001; Hla *et al.*, 2001; 2003; Pyne und Pyne, 2002). Die Entdeckung, daß S1P ein Ligand für Zelloberflächenrezeptoren wie Edg-1 (Lee *et al.*, 1998; van Brocklyn *et al.*, 1998; Zondag *et al.*, 1998), Edg-3, Edg-5, Edg-6 und Edg-8 (Fukushima *et al.*, 2001) ist, zeigte, daß extrazellulärem S1P eine große Rolle in der Signalübertragung zugeschrieben werden kann. Weitere Untersuchungen an S1P-Rezeptoren offenbarten schließlich, daß die Bindung von S1P an Edg-1 die Migration und Chemotaxis der Zelle stimuliert (English *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999) und die Angiogenese reguliert (English *et al.*, 1999; 2002; Lee *et al.*, 1999). Es konnte auch gezeigt werden, daß über S1P-Rezeptoren die GTPasen Rac und Rho, die für die Bewegungen von Zellen eine Rolle spielen, aktiviert oder gehemmt werden können (Lee *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2000). Im Zusammenhang mit der Rac-gekoppelten Zellmigration weist der Edg-1-Rezeptor einige Besonderheiten auf. So stimuliert er beispielsweise die Proteinkinase B (Akt), welche wiederum den Edg-1-Rezeptor phosphoryliert. Die Phosphorylierung ist letztendlich für die Rac-Aktivierung erforderlich (Lee *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu führt die Bindung von S1P an Edg-3 und Edg-5 zu einer Rho-vermittelten Ausbildung der Aktin-Stress-Fasern (Okamoto *et al.*, 2000). Zudem kann über die beiden letztgenannten Rezeptoren die Proliferation einer Zelle induziert und die Apoptose gehemmt werden, wie kürzlich an HTC4 Zellen gezeigt (An *et al.*, 2000). Desweiteren wird dem Edg-5-Rezeptor eine wichtige Rolle während der neuronalen Differenzierung und Entwicklung zugeschrieben (Mc Lennan *et al.*, 1997). Interessant war auch die Entdeckung, das Edg-1 durch den Wachstumsfaktor *platelet-derived growth factor* (PDGF) aktiviert werden kann, was zeigt, daß ein neues Konzept für eine „*cross-communication*“ zwischen einem Tyrosinkinaserzeptor und einem G-Protein-gekoppelten

Rezeptor vorhanden sein kann (Hobson *et al.*, 2001). Eine weitere Besonderheit zeigt der Edg-1-Rezeptor in der Calciummobilisierung. So konnte an HEK-293-Zellen gezeigt werden, daß über diesen Rezeptor Proteinkinase C (PKC) und G_i -abhängig das Calciumsignal intrazellulär gehemmt wird (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002).

Mit der Entdeckung, daß S1P in der Signaltransduktion eine große Rolle spielt, wuchs in den vergangenen Jahren zunehmend die klinische Bedeutung dieses Sphingolipids. So konnte gezeigt werden, daß in Aszites, bei Patienten mit Eierstockkrebs, der S1P-Spiegel erhöht ist (Hong *et al.*, 1999). Da auch Sphingosinkinasen als Oncogene fungieren können, wurde daraufhin vorgeschlagen, Sphingosinkinase-Inhibitoren in die Zellen einzuschleusen, die bei der Krebstherapie helfen könnten (Xia *et al.*, 2000).

Auch in der Immunabwehr scheint S1P eine große Rolle zu spielen, denn während ein erhöhter Sphingosinspiegel in Mastzellen die allergische Antwort und Produktion von Leukotrienen hemmt, aktiviert ein erhöhter S1P-Spiegel die Mastzellen und somit die Leukotrienproduktion (Prieschl *et al.*, 1999).

2.2. Intrazelluläre Wirkungen von S1P

Intrazellulär vermittelt S1P unter anderem eine Calciummobilisierung (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a; Young *et al.*, 2001), wobei der Mechanismus dieser Ereignisse bisher nicht erklärt werden konnte. Es wird vermutet, daß S1P einen spezifischen Ca^{2+} -permeablen Kanal am Endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert (Ghosh *et al.*, 1994; Mattie *et al.*, 1996). S1P ist auch in Pflanzen ein Calcium-mobilisierendes Molekül. Bei Trockenheit steigt die S1P-Konzentration in den Porenzellen an und reguliert somit den Schließmechanismus der Stomata (Ng *et al.*, 2001).

Der Gehalt an S1P in einer Zelle wird bestimmt durch Sphingosinkinasen und Phosphohydrolasen (Payne *et al.*, 2002), wobei die S1P-Degradation durch S1P-Lyasen (van Veldhoven *et al.*, 1991) und S1P-Phosphatasen (Mandala *et al.*, 2000) katalysiert wird.

2.3. Sphingosinkinasen

Sphingosinkinasen, welche Sphingosin zu S1P phosphorylieren (Olivera *et al.*, 1998), können durch verschiedene extrazelluläre Wachstums-Faktoren, Überlebens-Faktoren und

Cytokine wie PDGF (Olivera *et al.*, 1993; Bornfeldt *et al.*, 1995), *nerve growth factor* (NGF) (Edsall *et al.*, 1997; Rius *et al.*, 1997), Vitamin D₃ (Kleuser *et al.*, 1998; Manggau *et al.*, 2001), *epidermal growth factor* (EGF) (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1999), Muskarinrezeptor-Agonisten (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a), *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) (Xia *et al.*, 1998), Kopplung der Immunglobulin-Rezeptoren FcεR1 (Choi *et al.*, 1996) und FcγR1 (Melendez *et al.*, 1998), N-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin (fMLP), Adenosintriphosphat (ATP) (Alemany *et al.*, 1999) und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) (Buehrer *et al.*, 1996) aktiviert werden.

Werden Sphingosinkinasen durch Überlebensfaktoren stimuliert, steigt die intrazelluläre S1P-Konzentration, was wiederum zur Unterdrückung der Apoptose führt (Cuvillier *et al.*, 1998). Ob eine Zelle überlebt oder stirbt, hängt in diesem Fall von der dynamischen Balance zwischen den beiden Sphingolipidmetaboliten Ceramid und S1P ab. So hemmt intrazellulär erhöhtes S1P besonders die Ceramid-induzierte Aktivierung der Stress-aktivierenden Proteinkinasen SAPK/JNK, welche die Apoptose einer Zelle auslösen können (Cuvillier *et al.*, 1996). Der Schutz verschiedener Zellen vor dem Zelltod kann auch durch die erhöhte Tätigkeit des Transkriptionsfaktors NFκB gewährleistet sein, dessen Aktivität ebenfalls durch erhöhtes S1P stimuliert wird (Malinin *et al.*, 1997; Stehlik *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998).

Nach der durch TNF-α induzierten Stimulation der Sphingosinkinasen kann erhöhtes intrazelluläres S1P sogar die Aktivität der GTP-Cyclohydrolase 1 und die Biosynthese des NO-Synthase-Cofaktors BH4 stimulieren (Vann *et al.*, 2002).

Aktiviert TNF-α die Sphingosinkinase-1 (SphK1), werden gleichzeitig Endothelzellen vor dem durch TNF-α induzierten apoptotischen Effekt geschützt, da TNF-α durch Stimulation von Ceramiden den Zelltod vermittelt. In diesem Fall ist S1P ein Antagonist der durch TNF-α induzierten Apoptose. Durch Zugabe von Dimethylsphingosin (DMS) konnte der durch S1P induzierte Apoptoseschutz aufgehoben werden (Xia *et al.*, 1999).

Eine weitere Gruppe der Substanzen, die Sphingosinkinasen aktivieren, stellen die Phospholipide dar. Saure Phospholipide wie Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol und Cardiolipin induzieren beispielsweise einen konzentrationsabhängigen Anstieg der SphK-Aktivität in Swiss 3T3-Fibroblasten, während neutrale Phospholipide wie z.B. Phosphatidylcholin keinen aktivierenden Effekt zeigten (Olivera *et al.*, 1996).

Es sind bislang zwei verschiedene Sphingosinkinasen, SphK1 und SphK2 kloniert und sequenziert worden, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Diacylglycerolkinasen aufweisen (Kohama *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Melendez *et al.*, 2000; Nava *et al.*, 2000; Pitson *et al.*,

2000). SphK1 phosphoryliert überwiegend D-*erythro*-Sphingosin (Kohama *et al.*, 1998), während SphK2 als Substrat D-*erythro*-Dihydrosphingosin bevorzugt (Liu *et al.*, 2000). Anders als die SphK1 phosphoryliert die SphK2 zusätzlich D,L-*threo*-Dihydrosphingosin (DHS) (Liu *et al.*, 2000), ein Lipid, welches die SphK-Aktivität kompetitiv hemmt (Kohama *et al.*, 1998). DMS hemmt hingegen die Aktivität beider Sphingosinkinasen, die SphK1 kompetitiv, die SphK2 nicht-kompetitiv (Liu *et al.*, 2000).

Ein Vergleich der Sphingosinkinase-Gensequenzen in der Datenbank zeigte, daß diese Enzyme hochkonservierte Bereiche enthalten, die Homologien zu Genen in den verschiedensten Organismen wie Pflanzen, Einzellern, Würmern und Säugetieren aufweisen (Kohama *et al.*, 1998). Zum Beispiel zeigte sich, daß die hSphK1 mit der mSphK1 zu 85% identisch ist (Nava *et al.*, 2000). Vergleiche dieser Art haben auch gezeigt, daß die Gene LCB4 und LCB5 in *Saccharomyces cerevisiae* Sphingosinkinasen kodieren (Nagiec *et al.*, 1998).

Die SphK1a, eine Isoform der SphK1, die in dieser Arbeit verwendet wurde, beinhaltet vermeintliche Phosphorylationsmotive für Proteinkinase A (PKA), PKC und Caseinkinase II (Kohama *et al.*, 1998). Zusätzlich enthält sie multiple Ca²⁺/Calmodulin-bindende Consensussequenzen und eine SH3-bindende Sequenz. Es wird vermutet, daß die Ca²⁺/Calmodulinsequenzen verantwortlich sind für die Aktivierung und Translokation des Enzyms zur Plasmamembran (Young *et al.*, 2002).

Messungen mit radioaktiv markiertem ATP haben gezeigt, daß die SphK1 unabhängig von Agonistenstimulation eine hohe basale Aktivität aufweist (Pitson *et al.*, 2000).

Beide Sphingosinkinasen sind cytosolisch, wobei die SphK1 bis zu 30 % membranassoziiert sein soll, obwohl membranspannende Domänen nicht vorhanden sind (Nava *et al.*, 2000). Exprimiert wird die SphK1 überwiegend in Milz, Thymus, Niere, Hirn und den Blutleukozyten. Die SphK2-Expression konnte in Hirn, Herz, Nieren, Hoden und Leberzellen nachgewiesen werden (Melendez *et al.*, 2000). Das Gen der SphK1 ist auf dem Chromosom 17 und das Gen der SphK2 auf dem Chromosom 19 lokalisiert.

Während die SphK1 in ihrer Funktion bereits gut untersucht worden ist, weiß man bislang nur sehr wenig über die SphK2. Es wird vermutet, daß die SPK2 vielleicht in der Angiogenese, der Immunantwort oder allergischen Reaktion involviert sein könnte (Liu *et al.*, 2000). Eine neue Arbeit zeigte zudem, daß die SphK2 die Apoptose induziert und die Proliferation unterdrückt (Liu *et al.*, 2003).

2.4. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit untersucht die intrazelluläre Produktion und Wirkung von S1P. Intrazelluläre Wirkungen von S1P waren zu Beginn der Arbeit nur schlecht charakterisiert und teilweise nicht sicher belegt. Deshalb war eines der Ziele dieser Arbeit, ein geeignetes Modell zu finden, in dem eine intrazelluläre Wirkung von S1P nachgewiesen und charakterisiert werden konnte. Vorarbeiten hatten gezeigt, daß eine Stimulation von Zellen aus der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 mit Bradykinin oder durch KCl-Depolarisation zur raschen intrazellulären Bildung von S1P durch Sphingosin führt (Alemany *et al.*, 2001). Eine Hemmung der Sphingosinkinase bewirkte eine Hemmung der durch Bradykinin oder KCl stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung (Alemany *et al.*, 2001 und Lass, 2000). Vermutlich war also das nach Stimulation intrazellulär gebildete S1P an der Mobilisierung von Ca^{2+} sowie an der Transmitterausschüttung beteiligt. Die Analyse der Ca^{2+} -Mobilisierung durch intrazelluläres S1P ist jedoch technisch schwierig und erfordert die intrazelluläre Mikroinjektion (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a) oder, wie kürzlich festgestellt, die Photolyse von intrazellulärem *caged* S1P (Meyer zu Heringdorf *et al.*, im Druck). Permeabilisierte PC12-Zellen sind andererseits ein viel verwendetes Modellsystem zur intrazellulären Analyse der Neurotransmitter-Exozytose (Ahnert-Hilger *et al.*, 1993). Deshalb sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob intrazelluläres S1P in PC12-Zellen die Noradrenalinausschüttung beeinflusst und ob sich daher die permeabilisierten PC12-Zellen möglicherweise als Modellsystem für die Identifizierung von intrazellulären Angriffspunkten von S1P eignen.

Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung der S1P-Produktion durch Sphingosinkinase. Dazu stand ein Konstrukt der SphK1 zur Expression in Säugerzellen zur Verfügung. Ausserdem lag eine der SphK2 stark verwandte Sequenz vor, die durch PCR mit von der SphK1 abgeleiteten degenerierten Primern gewonnen und in einen Klonierungsvektor eingebracht worden war (Alemany, unveröffentlichte Daten). Diese der SphK2 verwandte Sequenz sollte in Säugerzellen exprimiert und charakterisiert werden. Ausserdem sollte durch Überexpression beider Sphingosinkinase-Isoformen die intrazelluläre S1P-Konzentration chronisch gesteigert werden und der Einfluß auf bekannte intrazelluläre S1P-Wirkungen wie die Ca^{2+} -Mobilisierung untersucht werden.

Die Sphingosinkinase-Aktivität wird von einer Vielzahl verschiedener Membranrezeptoren stimuliert. Das Ausmaß der Stimulation beträgt dabei jedoch kaum mehr als 1,5fach der basalen Aktivität (Olivera *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1996; Melendez *et al.*,

1998; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a; Alemany *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2000). Deshalb ist es außerordentlich schwierig, den Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die Rezeptor-stimulierte Sphingosinkinase-Aktivität zu untersuchen und so, analog zu ähnlichen Untersuchungen zur Regulation der Phospholipase C (PLC), die Signaltransduktions-komponenten zu identifizieren, die an der Rezeptor-Regulation der Sphingosinkinase-Isoformen beteiligt sind. Entsprechend ist kaum etwas darüber bekannt, wie die Sphingosinkinase-Isoformen durch Membranrezeptoren angesteuert werden (Olivera *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 1996; Edsall *et al.*, 1997; Melendez *et al.*, 1998; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a; Xia *et al.*, 1998; Alemany *et al.*, 1999). Viele an der Signalübertragung innerhalb der Zelle beteiligten Enzyme ändern jedoch, wenn sie aktiviert werden, ihre subzelluläre Lokalisation, beispielsweise auch die PLC (Schmidt *et al.*, 2003). Deshalb sollte überprüft werden, ob nach Stimulation von Membranrezeptoren auch die Sphingosinkinasen ihre Lokalisation verändern. Falls dies der Fall sein sollte, dann sollte dieser Effekt dazu verwendet werden, die Signalübertragung vom Membranrezeptor zur Sphingosinkinase zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Name	Hersteller/Lieferfirma
Acrylamid	Serva
Agarose	Gibco BRL
Ammoniumperoxodisulfat	Serva
Ampicillin (Binotal [®])	Grünenthal
Ascorbinsäure	Sigma
ATP	Sigma
Atropin	Sigma
BAPTA/AM	Calbiochem
Bisacrylamid	Serva
BSA	Sigma
BSA, fettsäurefrei	PAA
Bradykinin	Sigma
1-Butanol	J. T. Baker
Carbachol	Sigma
Chloroform	J. T. Baker
Chloroquindiphosphat	Sigma
Cytochalasin B	Calbiochem
DHS	Biomol
Dihydro-S1P	Biomol
Dichlormethan	Merck
Digitonin	Sigma
DMEM/F12 mit L-Glutamin	Gibco BRL
DMS	Biomol
DMSO	Sigma

DNA Molekulargewichts-Standard	MBI Fermentas
ECL [®] -Westernblot-Reagenz	Amersham
EGF	Calbiochem
Essigsäure (96 %)	J. T. Baker
Ethanol	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
FKS	Gibco BRL
Fura-2/AM	Molecular Probes
G418	PAA
Genistein	Calbiochem
Glycerol	Sigma
Gö6976	Calbiochem
HEPES	Serva
Ionomycin	Calbiochem
IPTG	Stratagene
Isopropanol	J. T. Baker
Kaliumglutamat	Sigma
Kanamycin	Sigma
LB-Agar	Gibco BRL
LB-Broth-Base	Gibco BRL
LPA	Sigma
Magermilchpulver	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	J. T. Baker
Mineralöl	Sigma
Mowiol [®]	Calbiochem
NaAc	Merck
Ninhydrin	Sigma
PDGF	TEBU
Phosphatase, alkalische (AP)	Boehringer Mannheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA
PMA	Sigma
PIPES	Merck
Poly-L-Lysin	Sigma

Ponceau S	Sigma
Protein-Molekulargewichtsstandard	Sigma
Proteinstandard	Biorad
PTX	List Biological Laboratories INC
RNase	Sigma
Serva Blau (G/R)	Serva
SDS	Serva
S.O.C.-Medium	Gibco BRL
Sphingosin	Biomol
S1P	Biomol
SPC	Biomol
Streptolysin O	Sigma
TEMED	Serva
Tetanolysin	List Biological Laboratories INC
Thapsigargin	Calbiochem
Thrombin	Sigma
Trypsin	PAA
Tween [®] 20	Sigma
U73122	Sigma
W7	Calbiochem
X-gal	Boehringer Mannheim

3.1.2. Radioaktive Chemikalien

Substanz	Hersteller/Lieferfirma
[2,5,6- ³ H]Noradrenalin (55,0 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Science
[3- ³ H]Sphingosin (20,0 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Science

3.1.3. Antikörper

Bezeichnung	Hersteller/Lieferfirma
Anti-c-myc-Antikörper (Maus)	Oncogene, Clontech

Anti-YFP-Antikörper: <i>Living Colour A. v.</i> (Kaninchen)	Clontech
Anti-Ziege IgG/Peroxidase-Konjugat (Kaninchen)	Sigma
Anti-Maus IgG/Peroxidase-Konjugat	Sigma
Anti-Maus IgG/FITC-Konjugat	Sigma

3.1.4. Restriktionsenzyme

Enzym	Herkunft	Erkennungssequenz	Hersteller/Lieferfirma
BamHI	(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	G↓GATCC	Invitrogen / Gibco BRL
NotI	(<i>Nocardia otitidis-cavarium</i>)	GC↓GGCCGC	Invitrogen / Gibco BRL
Sall	(<i>Streptomyces albus G</i>)	G↓TCCAC	Invitrogen / Gibco BRL
XbaI	(<i>Xanthomonas baidri</i>)	T↓CTAGA	Invitrogen / Gibco BRL

3.1.5. Vektoren

Bezeichnung	Hersteller/Lieferfirma
pGEM [®] -TEasy	Promega
pCMV3B	Statagene
pcDNA3	Invitrogen
pEYFP-C	Clontech

3.1.6. DNA-Konstrukte

Bezeichnung	Erzeuger oder Lieferfirma
SphK1a-pcDNA3	Dr. Sarah Spiegel
hSK2-Bluescript	Dr. Regina Alemany
pECFP-ER	Clontech
pECFP-Golgi	Clontech
pCDNA.3 VSV PDGFRβ	Dr. Axel Ullrich

pcDNA3-B ₂ R	Dr. Andree Blaukat
pCIS-Gα _{i2} konst. akt.	Dr. Thomas Wieland
pCIS-Gα _q konst. akt.	Dr. Thomas Wieland
pCIS-Gα _q Wildtyp	Dr. Thomas Wieland

3.1.7. *E. coli* Stämme

Bezeichnung	Hersteller/Lieferfirma
DH5α	MBI Fermentas
JM110	MBI Fermentas

3.1.8. Primer (Firma Roth)

Bezeichnung	Sequenz
RA1:	5' CGC CAC TGG CTG CCA GCA C 3'
RA5:	5' CAC CGT GCC CAG TGT GAA GC 3'
RA7:	5' GGG TAG GAG CCA AAC TCG CC 3'
RA10:	5' TAA ATG ATT GGA TGT TTG CAT GCC 3'
RA20:	5' CGG CCT GGT GCA CCT GTG C 3'
RA24:	5' AAA CCA TGG TCC CCG GCA CGT CAG GGA C 3'
MZH1:	5' AAA GGA TCC ATG GCC CCG CCC CCA C 3'
MZH2:	5' CCT TAG CCC TGA CCA GGG TG 3'
KD4:	5' ATG GCC CCG CCC CCA CCG CCA C 3'
KD5:	5' ATG ATT GGA TGT TTG CAT GCC CGG GTC 3'
KD6:	5' ACC CTA TCC TCC CAC CGC CTC CG 3'

3.1.9. Sonstige Materialien

Name	Hersteller/Lieferfirma
AGFA APX Filme	Agfa
Chromatographie-Blotpapier	Whatman

Druckfilter	Sartorius
Emulsifier Scintillator Plus/299	Packard
Faltenfilter	Macherey-Nagel
Filmentwickler Lösung Neutol Liquid NE	Agfa Gevaert
Filmfixierer Lösung Agefix	Agfa Gevaert
Gewebekulturplatten	Falcon®
Glasfaserfilter	Whatman
Kammeraufsätze auf Glas	Falcon®
Kammergläser	Nunc
Kodak X-OMAT AR-Filme	Kodak
Kryoröhrchen	Greiner
Mikroskopische Deckgläser	Amefa
Nitrocellulosemembranen	Advanced Microdevices
Sterilfilter	Sartorius
Szintillationsgefäße	Packard
TLC-Fertigplatten (Kieselgel 60 A)	Whatman

3.1.10. Kits

„RNAeasy Mini Kit“	Qiagen
„Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit“	Sigma
„ReadyMix™ Taq with MgCl ₂ “	Sigma
„QIAquick® Gel Extraction Kit“	Sigma
„Plasmid Mega Kit“ oder „EndoFree™ Plasmid Mega Kit“	Qiagen
„BCA Protein Reagent Kit“	Pierce

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Zellkulturarbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank (LaminarAir HS 12, Heraeus) mit sterilen Arbeitsgeräten, Lösungen und Medien statt, wobei die Medien sterilfiltriert und sämtliche Arbeitsgeräte und Lösungen zuvor bei 121 °C für 30 min autoklaviert worden waren.

Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293) und Phäochromozytomzellen der Ratte (PC12) wurden in einem Brutschrank (BB16, Heraeus) in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Für die Subkultivierung der Zellen wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in 10 ml Nährmedium von der Zellkulturschale abgelöst. Anschließend wurden die Zellen auf neue Zellkulturschalen verteilt. Die Zellen wurden pro Zellschale in einem Endvolumen von 25 ml Nährmedium (DMEM/F12, 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Stabil transfizierten Zellen wurden zur Selektion zusätzlich das Neomycin-Analogon G418 (0,5 mg/ml) zugefügt. Schälchen, Kammergläser, Gewebekulturplatten und mikroskopische Deckgläschen wurden vor der Kultivierung für 30 min mit 0,00125 % (m/v) Poly-L-Lysin (MW > 300 kDa) vorbehandelt, um ein besseres Anhaften der Zellen zu erreichen.

Zur Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert und im entsprechenden Nährmedium mit 10 % DMSO (v/v) und 20 % FKS (v/v) resuspendiert, zu je 1,8 ml in Kryoröhrchen aliquotiert, bei -70 °C für ca. 24 h zwischengelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

3.2.2. RNA-Präparation

Die Zellen wurden 1 Tag vor der RNA-Präparation auf eine Zellkulturschale (Ø 10 cm) ausgesät. Die Präparation erfolgte mit dem „*RNeasy Mini Kit*“ der Firma Qiagen, indem das Medium abgesaugt und die Zellen mit 600 µl RLT-Puffer (mit 10 µl 2-Mercaptoethanol pro 1 ml Puffer) lysiert wurden. Das Zellysat wurde in *QIAshredder* Säulen pipettiert und 2 min zentrifugiert, um das Lysat zu homogenisieren. Zu dem Durchfluß wurden 600 µl 70 % Ethanol pipettiert und mit dem Homogenisat gemixt. Das Präzipitat wurde in einer *RNeasy mini spin* Säule 1 min bei 10000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Waschen der an der Säulenmembran gebundenen RNA erfolgte durch Zugabe von 700 µl

RW1-Puffer. Nach der Zentrifugation für 1 min bei 10000 Upm wurde die RNA mit 500 µl RPE-Puffer erneut gewaschen. Zum Trocknen der Säulenmembran wurde für 2 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser in die Mitte der Membran und Zentrifugation für 1 min bei 10000 Upm. Anschließend wurde die RNA-Konzentration durch UV Spektroskopie (Spektrometer LKB Biochrom Ultraspec II Pharmacia) bei einer Absorption von 260 nm bestimmt.

3.2.3. Reverse Transkription

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des „*Enhanced Avian RT First Strand Synthesis Kit*“ der Firma Sigma durchgeführt. 5 µl RNA (0,25 µg/µl) und 1 µl *Random nonamer primer* (2,5 µM) wurden in einem Endvolumen von 10 µl Wasser gemixt, anzenrifugiert und für 10 min bei 70 °C in einem Heizblock erhitzt. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurden zu dem RNA-Primermix 2 µl 10x Puffer, 1 µl Desoxynucleotidmix (dNTPs, 500 µM), 1 µl *Enhanced avian RT* (1 U/µl), 1 µl RNase-Inhibitor (1 U/µl) und 5 µl Wasser gegeben. Der Mix wurde anschließend bei 25 °C für 15 min und bei 50 °C für 50 min inkubiert.

3.2.4. RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit dem „*ReadyMix™ Taq with MgCl₂*“ der Firma Sigma durchgeführt. Zu 3 µl cDNA (0,3 µg/µl) wurden 25 µl 2x PCR Ready-Mix (1,5 U Taq Polymerase, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine, 0,2 mM dNTPs, Stabilisatoren) 4 µl *Forward Primer* (10 µM), 4 µl *Reverse Primer* (10 µM) und 14 µl Wasser pipettiert. Der Mix wurde nach dem Mischen mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte in 35 Zyklen, wobei die cDNA zuerst für 3 min bei 95 °C in Einzelstränge zerlegt wurde. Dann folgten 1 min bei 95 °C, 1 min bei 62 °C, 3 min bei 72 °C im Zyklus und abschließend 15 min bei 72 °C.

3.2.5. Gelelektrophorese

Die DNA wurde elektrophoretisch in einem 1 % igen Agarosegel bei 90 mA und 150 V in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurden mit einem „*Mass Ruler™ DNA Ladder, High Range and Low Range*“ der Firma MBI Fermentas bestimmt.

TAE 50x: 2 M Tris-HCl
 0,5 M Na₂EDTA
 50 µl Ethidiumbromid pro l Wasser

3.2.6. Restriktion mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit 1 µg DNA und 5 U Enzym/µg DNA, sowie 2 µl (10x) Restriktionspuffer (REact® 2, 3, oder 10). Bei einer Temperatur von 37 °C wurde die DNA für 1 h restringiert. Für die spätere Elution von DNA aus einen Agarosegel wurden 10-20 µg DNA in einem Endvolumen von 50 µl und der entsprechenden Erhöhung des Puffers restringiert.

REact® 2 10x: 50 mM Tris-HCl
 10 mM MgCl₂
 50 mM NaCl
 pH 8,0

REact® 3 10x: 50 mM Tris-HCl
 10 mM MgCl₂
 100 mM NaCl
 pH 8,0

REact® 10 10x: 100 mM Tris-HCl
 10 mM MgCl₂
 150 mM NaCl
 pH 7,6

3.2.7. Elution von DNA aus einem Agarosegel

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter einer UV-Lampe mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und gewogen. Die Elution erfolgte mit einem „*QIAquick*[®] Gel Extraction Kit“ der Firma Sigma. Zu einem Volumen Gel wurden 3 Volumen QG-Puffer pipettiert, um das Agarosegel dann bei 50 °C für 10 min aufzulösen. In diese Lösung wurde 1 Volumen Isopropanol gegeben, gevortext und in einer *QIAquick spin* Säule für 1 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Säulenmembran mit 0,5 ml QG-Puffer versetzt und erneut für 1 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Zum Waschen der DNA wurden 0,75 ml PE-Puffer auf die Säule pipettiert und erneut 1 min bei 10000 Upm zentrifugiert. Die getrocknete Säule wurde auf ein Mikrozentrifugenröhrchen gesetzt, auf die Säulenmembran 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) gegeben und für 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert.

3.2.8. Dephosphorylierung des Vektors

Bei der Dephosphorylierung wurden durch Zugabe von 4 µl Alkalische Phosphatase, 10 µl 10x Puffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, pH 9,0), 30 µl DNA-Lösung und 56 µl Wasser die 5'-Phosphatgruppen des Vektors entfernt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1 h. Der Vektor wurde mit 1 Volumen 5 M Ammoniumacetat und 100 % Ethanol gefällt, mit 70%igen Ethanol gewaschen und in TE Puffer rückgelöst.

TE 10/1: 100 mM Tris-HCl
 1 mM Na₂EDTA
 pH 7,5

3.2.9. Ligation

Für die Ligationsreaktion wurden die T4-Ligase 1 U und der entsprechende 10x Puffer (300 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,8) 1 µl von der Firma Promega verwendet. Für die Reaktion wurde die DNA Menge folgendermaßen berechnet:

Fragmentgröße x 100 ng Vektor x 3 (oder x 2 bei dephosphoryliertem Vektor) = X ng DNA
Vektorgroße

Die Ligation erfolgte in einem mit Wasser aufgefüllten Endvolumen von 10 µl bei 4 °C über Nacht.

3.2.10. Kompetente Bakterien

Eine Vorkultur wurde in 2 ml LB-Medium bei 37 °C über Nacht in einem Warmluftschüttler kultiviert und anschließend in 400 ml LB-Medium für 2 h inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 wurden die Bakterien für 15 min auf Eis gestellt. Je 100 ml Bakterienkultur wurden in je vier 50 ml Zentrifugenröhrchen für 7 min bei 4 °C bei 3000 Upm sedimentiert. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 10 ml MgCl₂ (100 mM) resuspendiert und erneut für 7 min bei 4 °C bei 3000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml CaCl₂ (100 mM) resuspendiert und 20 min inkubiert bei 4 °C. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 3000 Upm wurde das Sediment in 1 ml 100 mM CaCl₂ in Glycerin aufgenommen und in 100 µl Portionen bei -80 °C gelagert.

3.2.11. Agarplatten

LB-Agar wurde in Wasser gegeben (32 g/l), autoklaviert und auf ca. 50 °C abgekühlt. Nach Zugabe der entsprechenden Antibiotika (100 µg/ml) wurde das warme Agar jeweils in 10 cm Zellkulturschalen gegossen. Für eine Blau-Weiß-Selektion wurden zusätzlich pro 1 Medium 200 µl Isopropylthiogalactosid (IPTG) (1 M) und 4 ml X-Gal (1% in N'-N-Dimethylformamid) zugesetzt.

3.2.12. Transformation kompetenter Bakterien und Präparation von Plasmid-DNA

(Asubel *et al.*; 1989; Birnboim, 1979; Sambrook *et al.*, 1989)

Der Ligationsansatz bzw. 1 µg DNA wurden mit 100 µl kompetenter Bakterien versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Für die Hitzeschockbehandlung wurde der Ansatz für 90

s bei 42 °C erhitzt und anschließend erneut für 5 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden mit 1 ml S.O.C.-Medium versetzt und für 60 min bei 37 °C in einem Warmluftschüttler (Certomat[®], H. B. Braun) inkubiert. Jeweils 50-100 µl der Bakterienkultur wurden auf eine Agarplatte ausgestrichen und für 24 h in einem Brutschrank (GTR 0241, Memmert) bei 37 °C kultiviert. 3 ml LB-Medium mit Antibiotika (100 µg/ml) wurden in „*snap-cap*“-Röhrchen mit einer Plasmid-tragenden Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C im Warmluftschüttler für 24 h kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend mit Glycerol (ca. 70 %) versetzt und bei -80 °C gelagert.

Zur Präparation der Plasmid-DNA wurden je 100 µl der Glycerolstocks in 1,5 l LB-Medium mit entsprechendem Antikörper (100 µg/ml) überführt und über Nacht im Warmluftschüttler bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des „*Plasmid Mega Kit*“ oder mit „*EndoFreeTM Plasmid Mega Kit*“ der Firma Qiagen. Die Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des vom Hersteller mitgelieferten Protokolls. Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde durch UV-Spektroskopie in Quarzglasküvetten (Spektrometer LKB Biochrom Ultraspec II Pharmacia) bei 260 nm bestimmt.

3.2.13. Transfektion von Zellen mittels der Calciumphosphatmethode

(Asubel *et al.*, 1989)

Zur Transfektion wurden Zellen benutzt, die ca. 80 % konfluent gewachsen waren. Die entsprechende Menge rekombinanter Plasmid-DNA wurde zur Sterilisation mit Ethanol und Natriumacetat ausgefällt. Die DNA wurde in 700 µl sterilem Wasser gelöst und mit 300 µl CaCl₂ (2 M) versetzt. Nach Zugabe von 1 ml HeBS 2 x wurde die Lösung gevortext und bei RT für 10 min stehengelassen, um die DNA zu präzipitieren. Das Präzipitat und 10 µl Chloroquin (10 mM) pro ml Medium wurden auf die Zellschale gegeben und 4 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FKS-freiem Medium gewaschen und in DMEM/F12-Medium weiter kultiviert.

HeBS 2 x:	280 mM NaCl
	50 mM HEPES
	1,48 mM Na ₂ HPO ₄
	pH 7,05

3.2.14. Proteinbestimmung nach Bradford

(Bradford, 1976)

Die zu bestimmenden Proteinproben wurden in Einwegküvetten mit dH₂O auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und 200 µl Bradford-Reagenz addiert. Parallel dazu wurde eine Eichgerade mit Rinder-γ-Globulin im Konzentrationsbereich von 0,4-2,0 mg/ml angesetzt. Die Proben wurden gemischt und nach 10 min die OD bei 595 nm im Spektrometer (LKB Biochrom Ultraspec II, Pharmacia) bestimmt. Mittels der Eichgeraden ließ sich der Proteingehalt feststellen.

Bradford-Reagenz: 350 mg Serva-Blau G (Coomassie-Blau)
 250 ml Ethanol
 250 ml Phosphorsäure (85 %)
 ad 1 l dH₂O

3.2.15. Proteinbestimmung nach Pierce

Die Pierce Proteinbestimmung wurde mit dem „*BCA Protein Reagent Kit*“ der Firma Pierce durchgeführt. Zu je 10 ml des BCA Reagenz A wurden 200 µl des BCA Reagenz B pipettiert. 1 ml dieses Gemisches wurde anschließend zu 50 µl Zellysatz gegeben, gevortext und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Der Proteingehalt wurde in Halbmikroküvetten in einem UV Spektrometer bei einer OD von 562 nm gemessen. Die Eichgerade wurde mit Albumin in einem Konzentrationsbereich von 2,0-0,125 mg/ml angesetzt.

3.2.16. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunoblot-Analyse

(Laemmli, 1970; Towbin *et al.*, 1979)

Für die Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 30:0,8 eingesetzt und mittels TEMED und Ammoniumperoxodisulfat polymerisiert. Es wurden ca. 9 cm lange Gele mit einem Acrylamid-Anteil von 10 % eingesetzt. Das Sammelgel hatte einen Acrylamid-Anteil von 6 % (m/v). Der Molekulargewichtsstandard bestand aus Myosin (205 kDa), β-Galactosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa)

und Carboanhydrase (29 kDa). Die Elektrophorese wurde mit 36 mA pro Gel für ca. 4 h durchgeführt.

Trenngelpuffer 2x: 0,2 % SDS (m/v)
 750 ml Tris-HCl
 pH 8,8

Sammelgelpuffer 2x: 0,2 % SDS (m/v)
 250 ml Tris-HCl
 pH 6,8

Laufpuffer: 1 % SDS (m/v)
 200 ml Glycin
 25 mM Tris

Nach dem Auftrennen der Proteine wurden diese aus dem Polyacrylamidgel mit einer Stromstärke von ca. 100 mA bei 4 °C für 24 h in Blotpuffer auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Mit Ponceau S-Lösung wurden die transferierten Proteine angefärbt und die Standardproteine markiert. Die Membranen wurden 1 h lang mit 5 % (m/v) Magermilchpulver in TBS behandelt. Anschließend wurden die Membranen mit TBS gespült und mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in TBS mit 0,1 % BSA (m/v) gemäß den Herstellerangaben verdünnt. Danach wurden die Membranen erneut mit TBS gespült und für 30 min mit Magermilchpulver behandelt. Durch Spülung mit TBS wurde das Magermilchpulver entfernt und die Membranen mit dem zweiten Antikörper Anti-Maus oder Anti-Kaninchen IgG/Peroxidase-Antikörperkonjugat (Verdünnung gemäß den Herstellerangaben in TBS mit 0,1 % BSA m/v) für eine Stunde inkubiert. Nach Entfernen des zweiten Antikörpers durch dreimaliges Waschen mit TBS plus 0,2 % Tween[®] 20 (v/v) für 5 min und einmal mit TBS, wurden die Blots 1 min mit einer Mischung von je 3 ml ECL[®]-Reagenz 1 und 2 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Kodak X-Omat-Filmen.

TBS: 150 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl
 pH 7,3

Blotpuffer: 20 % Methanol (v/v)
 0,01 % SDS (m/v)
 300 mM Glycin
 40 mM Tris

Ponceau S-Lösung: 5 % Essigsäure (v/v)
 0,1 % Ponceau S (m/v)

3.2.17. Bestimmung der S1P-Produktion

Zur Messung der [^3H]S1P-Produktion wurde eine Zellsuspension in HBSS hergestellt. Gestartet wurde die Reaktion, indem 100 μl der Suspension zu einem Reaktionsmix, bestehend aus BSA (2 mg/ml), [^3H]Sphingosin (1 $\mu\text{Ci/ml}$) und dem entsprechenden Agonist in HBSS pipettiert wurden. Inkubiert wurde bei 37 °C für die angegebenen Zeiten. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml kaltem HBSS mit BSA (1 mg/ml) und Filtration über Glasfaserfilter (Whatman GF/C) gestoppt. Die Filtration erfolgte, um eventuell freigesetztes, extrazelluläres [^3H]S1P abzutrennen. Die Filter wurden mit 2,5 ml Methanol/Chloroform (2/1) extrahiert und für 10 min bei 3400 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac Plus SC 110 A, Savant) lyophilisiert. Die getrockneten Lipide wurden in 40 μl Dichlormethan gelöst und auf TLC-Platten (Whatman Kieselgel 60 A) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung in Butanol/Essigsäure/ H_2O (3/1/1) wurden die Lipide mit Ninhydrin angefärbt, die entsprechenden Banden abgekratzt und die Radioaktivität mittels Flüssigszintillation in einem Szintillationszähler bestimmt.

3.2.18. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

(Grynkiewicz *et al.*, 1985)

Zur Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde der Ca^{2+} -Chelator Fura-2/AM eingesetzt. Der fluoreszierende Farbstoff Fura-2 hat in der Ca^{2+} -gebundenen Form das Anregungsmaximum bei λ 340 nm und in der Ca^{2+} -freien Form bei λ 380 nm. Aus den Emissionsverhältnissen läßt sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach der Ratio-Methode wie folgt berechnen:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(R_t - R_{min}) / (R_{max} - R_t) F_{min380} / F_{380}$$

K_d	224 nM (Dissoziationskonstante von Fura-2 für Ca^{2+})
R_t	F_{340}/F_{380} zum Zeitpunkt t
R_{max}	F_{340max}/F_{380max} bei maximaler $[Ca^{2+}]_i$
R_{min}	F_{340min}/F_{380min} bei minimaler $[Ca^{2+}]_i$
F_{max380}	Emission nach Anregung bei λ 380 nm und bei maximaler $[Ca^{2+}]_i$
F_{min380}	Emission nach Anregung bei λ 380 nm und bei minimaler $[Ca^{2+}]_i$

Die Zellen wurden mit HBSS von der Zellkulturschale abgelöst und mit Fura-2/AM (1 μ M) für 1 h beladen. Der fluoreszierende Farbstoff Fura-2 wird dabei als zellgängiger AM-Ester angeboten. Intrazelluläre Esterasen spalten die AM-Gruppe ab, wodurch das freie Fura-2 in der Zelle angereichert wird. Nach dem Beladen wurde das überschüssige Fura-2/AM durch zweimaliges Waschen mit HBSS entfernt. Die Zellen wurden in HBSS resuspendiert und die $[Ca^{2+}]_i$ in einem Spektrofluorometer (Hitachi F2000) bestimmt. Dabei wurde alle 500 ms mit wechselnden Exzitationswellenlängen (340 nm und 380 nm) ein Messwert erhalten. Die maximale Emission von Fura-2 in der Ca^{2+} -gebundenen Form wurde nach der Permeabilisierung der Zellen mit Digitonin (0,03 %) bestimmt. Nach der Behandlung der Zellen mit EGTA (15 mM) wurde das Emissionsmaximum der Ca^{2+} -freien Form ermittelt.

HBSS:	118 mM NaCl
	5 mM KCl
	1 mM $CaCl_2$
	1 mM $MgCl_2$
	15 mM HEPES
	0,9 g/l Glucose
	pH 7,5

3.2.19. Messung der Noradrenalin-Freisetzung

Zur Bestimmung der Noradrenalin-Freisetzung wurden PC12-Zellen auf 24 well-Platten kultiviert. Vor dem Versuch wurden die Zellen mit [3H]Noradrenalin (0,1 μ Ci/ml) und 1 mM Ascorbinsäure in Zellkulturmedium für 2 h bei 37 °C im Brutschrank beladen.

Anschließend wurde das restliche [^3H]Noradrenalin durch zweimaliges Waschen mit FKS-freiem Medium entfernt und die Zellen erneut im Brutschrank bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen mit eiskaltem HBSS (2x) und einer Inkubationszeit in eiskaltem HBSS für 10 min, wurden die Zellen mit der jeweiligen Stimulationslösung in der angegebenen Konzentration behandelt. Die Agonisten wurden vorab in HBSS und BSA (1 mg/ml) gelöst. Die Stimulation erfolgte für 10 min bei 37 °C.

Sollten die Zellen vor der Stimulation permeabilisiert werden, wurden nach dem Waschen mit eiskaltem HBSS die porenbildenden Toxine Tetanolysin (20 U/ml) oder Streptolysin O (500 ng/ml) in KG-Puffer für 10 min zu den Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte auf Eis. Anschließend wurde die Toxin-Lösung abgesaugt und die Zellen für 10 min in KG-Puffer bei 37 °C inkubiert. Während die Toxine bei 0 °C lediglich an die Zellmembran binden, werden bei 37 °C die Poren gebildet (Ahnert-Hilger und Weller, 1993). Der KG-Puffer diente zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus in den permeabilisierten Zellen. Für die Stimulation wurden die Agonisten in KG-Puffer verdünnt, der zusätzlich ATP (5 mM) und BSA (1 mg/ml) enthielt. Die Stimulation erfolgte für 10 min bei 37 °C. Für die Stimulation von permeabilisierten Zellen mit Ca^{2+} wurden 650 μM CaCl_2 verwendet, um eine Endkonzentration von 10 μM freiem Ca^{2+} zu erreichen. Der KG-Puffer enthält EGTA und stellt daher ein Puffersystem für Ca^{2+} -Ionen dar. Die freie Ca^{2+} -Konzentration im KG-Puffer wurde mit einem dazu entwickelten Computerprogramm errechnet (Ahnert-Hilger und Weller, 1993) und durch Ca^{2+} -Messungen mit freiem Fura-2 im Spektrofluorometer überprüft.

Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Überstand sofort in Szintillationsgefäße pipettiert, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Zur Ermittlung des Noradrenalin-Gehaltes in den Zellen wurde der Zellrasen mit 1 ml Lysepuffer lysiert und die Radioaktivität im Lysat gemessen.

KG-Puffer:	150 mM Kaliumglutamat
	20 mM PIPES
	500 μM EGTA
	5 mM MgCl_2
	4,5 mM MgAc

Lyse-Puffer:	0,1 % SDS
	0,4 % NaOH
	2 % Na_2CO_3

3.2.20. Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen in lebenden Zellen

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen in lebenden Zellen wurden die SphK1- und SphK2-YFP-Fusionsproteine verwendet. Die transfizierten Zellen wurden auf Kammergläser (Lab-Tek™) oder mikroskopische Deckgläschen, die zuvor mit Poly-L-Lysin (0,00125 %) beschichtet worden waren, ausgesät. Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen und für die angegebenen Zeiten mit verschiedenen Stimuli, die in HBSS gelöst waren, inkubiert. Dabei wurde die Fluoreszenz der YFP-gekoppelten Proteine sowohl unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiovert S 100/MC 80/HBO 100 W) als auch mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM510; 63x/1.4 Plan-Apochromat Objektiv) beobachtet. Bei Verwendung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops erfolgte die Anregung des Fluoreszenzproteins bei 488 nm mit einem Argonlaser, während die Emission mit einem Bandpassfilter bei Wellenlängen oberhalb von 505 nm detektiert wurde. Die am Laserscanning-Mikroskop aufgenommenen Bilder wurden mit dem Programm LSM Image Browser (www.zeiss.de) bearbeitet.

3.2.21. Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen durch Immunfluoreszenz

Hierfür wurden die Konstrukte der SphK1 und SphK2 im pcDNA3-Vektor verwendet. Diese Sphingosinkinasen sind an ein myc-Epitop gekoppelt und lassen sich folglich mit einem Anti-myc-Antikörper anfärben. Die transfizierten Zellen wurden auf *culture slides* (Falcon) kultiviert. Die Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen, 4 min in Methanol auf Eis fixiert, zweimal mit HBSS gewaschen und mit einer HBSS/Milchpulver-Suspension für 1 h bei 37 °C versetzt. Nach dem Entfernen des Milchpulvers wurden die Zellen mit dem 1. Antikörper (Verdünnung in HBSS/BSA 1 % gemäß den Herstellerangaben) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und für eine halbe Stunde erneut mit Milchpulver versetzt, bevor sie mit dem FITC-konjugierten 2. Antikörper (Verdünnung in HBSS/BSA 1 % gemäß den Herstellerangaben) für 1 h bei 37 °C inkubiert wurden. Vor dem Eindeckeln der Zellen mit Deckgläschen wurde der *culture slide*-Aufsatz in 100 %igen Ethanol entfernt und Mowiol auf die angetrockneten Zellen pipettiert. Die Lokalisation der Proteine im Mikroskop erfolgte wie oben für die YFP-gekoppelten Sphingosinkinasen beschrieben. Da diese Immunfärbung nur zur Kontrolle der Protein-Expression diente, wurden für diese Arbeit keine Bilder aufgenommen.

3.2.22. Präsentation und statistische Auswertung der Messwerte

Die Graphiken wurden mit dem Programm Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt. Die statistische Auswertung der Daten zur Ca^{2+} -Messung erfolgte mit dem *one-sample t-test*. Für die statistische Auswertung der Daten zur Noradrenalin-Freisetzung wurde *two-way Anova* verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Noradrenalin-Freisetzung durch intrazelluläres S1P und Sphingosin in PC12-Zellen

Zellen der Phäochromozytom-Zelllinie PC12 speichern exogene und endogene Katecholamine und setzen sie nach Stimulation mit verschiedenen GPCR-Agonisten oder nach Depolarisation frei (Ahnert-Hilger und Weller, 1993). Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, daß die Stimulation von PC12-Zellen mit Bradykinin oder ihre Depolarisation mit hohen extrazellulären K^+ -Konzentrationen nicht nur $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und die Freisetzung von Noradrenalin verursacht, sondern auch zu einer gesteigerten intrazellulären Bildung von S1P führt (Alemany *et al.*, 2001). Eine Hemmung dieser S1P-Bildung durch die Sphingosinkinaseinhibitoren DHS und DMS führte konzentrationsabhängig zur Hemmung der durch Bradykinin oder KCl-Depolarisation induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung (Alemany *et al.*, 2001, Lass, 2000). Deshalb stellte sich die Frage, ob intrazelluläres S1P einen direkten Einfluß auf die Noradrenalin-Freisetzung haben könnte.

Wie in Abb. 1 dargestellt, hatte 1 μ M extrazelluläres S1P keinen Einfluß auf die Noradrenalin-Freisetzung in PC12-Zellen. Durch 1 μ M S1P werden die S1P-GPCR bereits maximal aktiviert, und folglich kann ausgeschlossen werden, daß S1P-GPCR in PC12-Zellen die Transmitter-Freisetzung stimulieren. Auch extrazelluläres SPC war unwirksam, während KCl-Depolarisation und Bradykinin die Noradrenalin-Freisetzung stimulierten (Abb. 1).

In permeabilisierten PC12-Zellen wird die Transmitter-Freisetzung durch Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration stimuliert (Ahnert-Hilger und Weller, 1993). Wie in Abb. 2 gezeigt, führte eine Anhebung der freien Ca^{2+} -Konzentration auf 10 μ M an permeabilisierten PC12-Zellen zur Freisetzung von Noradrenalin. Auch S1P (10 μ M) setzte an mit Tetanolysin oder SLO permeabilisierten PC12-Zellen Noradrenalin frei (Abb. 2). Da S1P an intakten Zellen in Konzentrationen, die S1P-GPCR maximal stimulieren, unwirksam war, ist seine Wirkung an permeabilisierten Zellen unabhängig von S1P-GPCR und vermutlich durch einen intrazellulären Angriffspunkt vermittelt.

Um die Wirkung von S1P an permeabilisierten PC12-Zellen untersuchen zu können, war es erforderlich, relativ große Poren zu bilden. So stimulierte in mit α -Toxin von *Staphylococcus aureus* permeabilisierten Zellen zwar Ca^{2+} die Exozytose, aber nicht S1P, das als BSA-Komplex angeboten wurde (nicht gezeigt). Die durch α -Toxin gebildeten Poren sind zu klein für die Passage von Proteinen, weshalb an diesem System das BSA gebundene S1P

vermutlich nicht in die Zellen hineingelangen konnte. Die durch SLO und Tetanolysin gebildeten Poren sind dagegen groß genug für die Passage von Proteinen, und hier war S1P wirksam (Abb. 2).

Von weiteren untersuchten Lysophospholipiden induzierte insbesondere Sphingosin (10 μM) die Freisetzung von Noradrenalin in permeabilisierten PC12-Zellen, während LPA (10 μM) und SPC (10-100 μM) inaktiv waren (Abb. 2). Dihydro-S1P war ebenfalls aktiv, doch war seine Wirkung nicht signifikant. Das Ausmaß der Noradrenalin-Freisetzung durch 10 μM S1P oder Sphingosin erreichte etwa die Hälfte der durch Ca^{2+} stimulierten Exozytose (Abb. 2).

Tatsächlich stimulierte also intrazelluläres S1P effektiv die Noradrenalin-Freisetzung in PC12-Zellen. Diese Wirkung war jedoch nicht spezifisch für S1P, sondern wurde auch mit Sphingosin beobachtet. Zudem war Sphingosin in vielen Experimenten stärker wirksam als S1P, weshalb es unwahrscheinlich ist, daß es in den permeabilisierten Zellen durch eine membrangebundene Sphingosinkinase phosphoryliert wird und als S1P seine Wirkung ausübt. Die Wirkung von Sphingosin war konzentrationsabhängig. Dabei zeigte sich eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve (Abb. 3). Mit 10-20 μM Sphingosin wurde eine maximale Wirkung erreicht, während höhere Konzentrationen (40 μM) wieder unwirksam waren (Abb. 3).

Abb. 1:

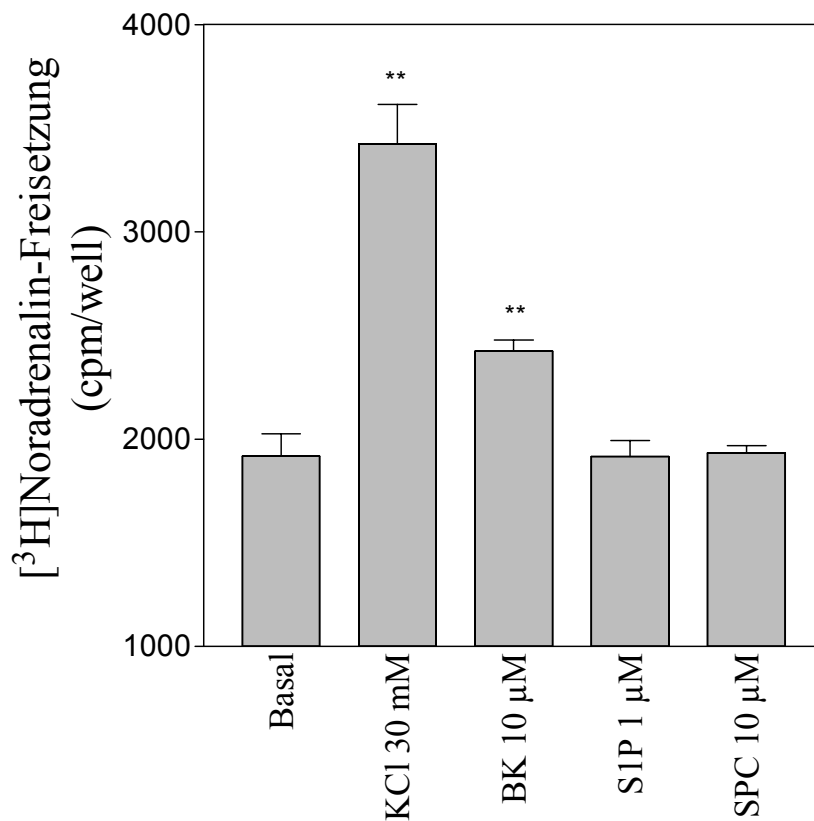


Abb. 1) Noradrenalin-Freisetzung von intakten PC12-Zellen

Die Zellen wurden mit [³H]Noradrenalin beladen und für 10 min mit KCl, Bradykinin (BK), S1P oder SPC stimuliert. Der [³H]Noradrenalin-Gehalt wurde im Überstand gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.D. aus einem repräsentativen Experiment, das in 3-fach Werten durchgeführt worden war. ** $P < 0,01$

Abb. 2:

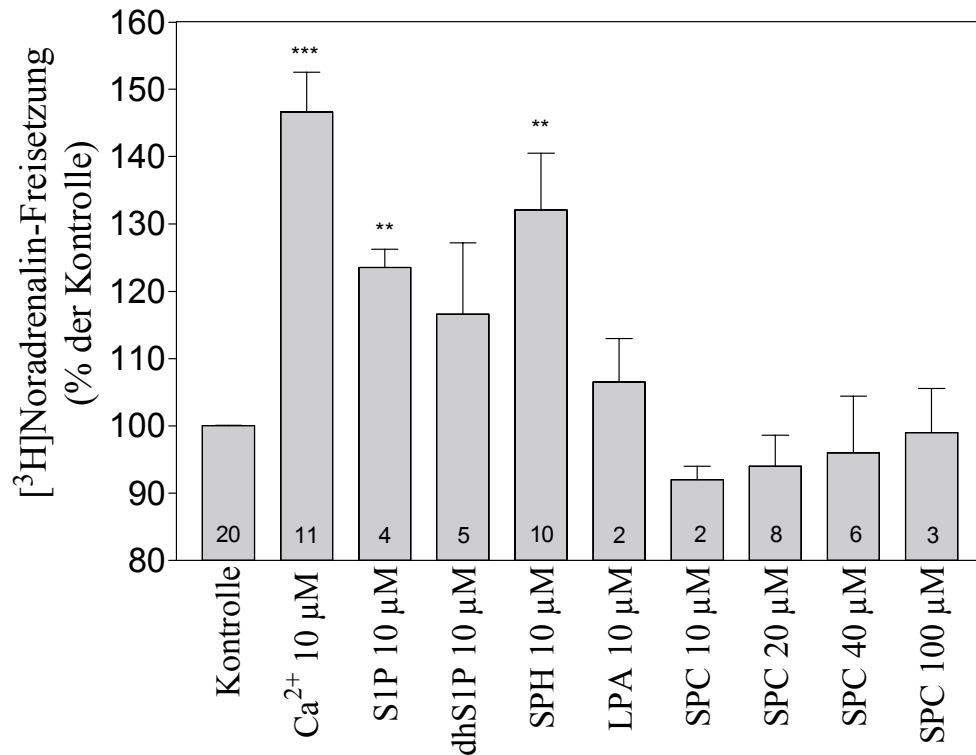


Abb. 2) Noradrenalin-Freisetzung in permeabilisierten PC12-Zellen

Die Zellen wurden mit [³H]Noradrenalin beladen. Permeabilisiert wurden die Zellen mit Tetanolysin (20 U/ml) oder SLO (500 ng/ml) in KG-Puffer. Die Stimulation erfolgte jeweils für 10 min mit S1P, Dihydro-S1P (dhS1P), Sphingosin (SPH), LPA oder SPC. Der [³H]Noradrenalin-Gehalt wurde im Überstand gemessen.

Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E.M.; die Zahl der Experimente wird in den Balken angegeben. *** $P < 0,001$ ** $P < 0,01$

Abb. 3:

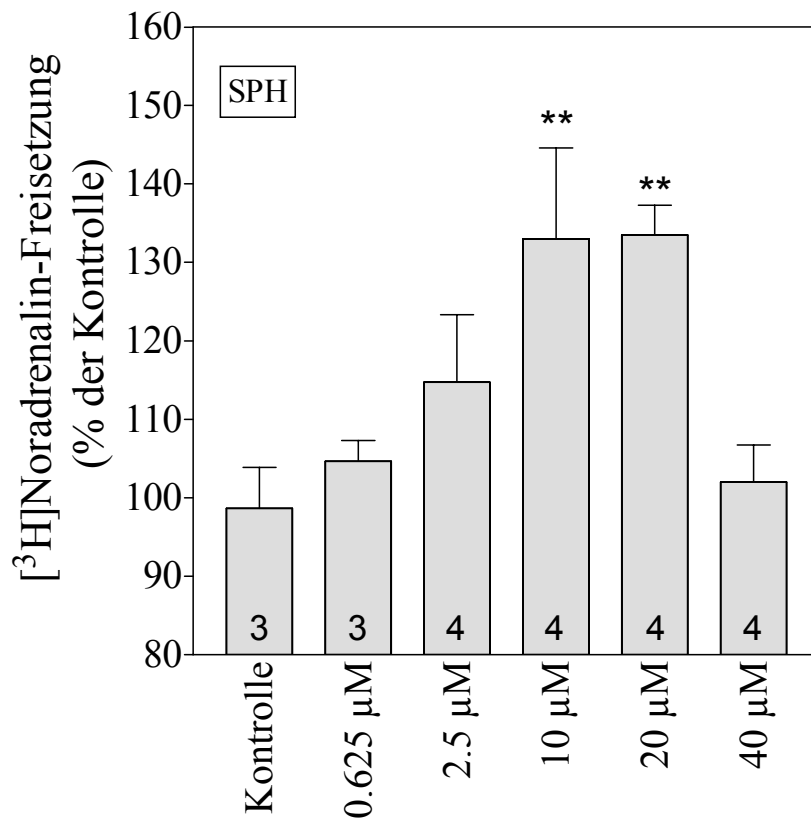


Abb. 3) Konzentrationsabhängigkeit der durch Sphingosin induzierten Noradrenalin-Freisetzung

Die Zellen wurden mit [³H]Noradrenalin beladen und mit Tetanolysin (20 U/ml) in KG-Puffer permeabilisiert. Die Stimulation erfolgte jeweils für 10 min mit den angegebenen Konzentrationen von Sphingosin. Der [³H]Noradrenalin-Gehalt wurde im Überstand gemessen.

Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E.M.; die Zahl der Experimente ist jeweils in den Balken angegeben. **
 $P < 0.01$

4.2. Klonierung und Expression einer SphK2-Variante

Eine der SphK2 sehr ähnliche humane Gensequenz wurde im Institut für Pharmakologie in Essen von Regina Alemany durch PCR mit von der SphK1 abgeleiteten degenerierten Primern gewonnen und in einen Klonierungsvektor (pBluescript) eingesetzt. Diese Gensequenz ist in Abb. 4 dargestellt. Das Konstrukt besitzt eine Länge von 3,11 kb, wobei der Leserahmen mit dem 1. ATG-Startcodon bei 709 bp beginnt und mit dem TAG-Stopcodon bei 2994 bp endet. Im gleichen Leserahmen befindet sich an Position 1003 bp ein zweites ATG-Startsignal.

Beim Vergleich dieser Sequenz mit der von Liu *et al.* (2000) zunächst beschriebenen Sequenz und einer später in der Genbank veröffentlichten SphK2-Sequenz (Zugangs-Nr. NM_020126.3) fällt folgendes auf (Abb. 5): Die in Essen identifizierte SphK2-Variante besitzt N-terminal ein größeres Fragment, ist dann vom zweiten offenen Leserahmen (Aminosäuresequenz MAPPPPP) bis kurz vor dem C-Terminus mit der ursprünglich identifizierten SphK2 (Liu *et al.*, 2000) identisch, hat aber im C-Terminus kleine Abweichungen und noch ein etwas längeres C-terminales Fragment. Wesentliche Teile dieser Sequenz stimmen also mit der ursprünglich identifizierten SphK2-Sequenz überein. Ein kleiner Teil des N-terminalen Fragmentes stimmt außerdem mit der später publizierten SphK2-Sequenz (NM_020126.3) überein. Die Nukleotidsequenz der in Essen identifizierten SphK2-Variante ist vollständig auf dem Chromosom 19 zu finden (Abb. 6).

Um zu überprüfen, ob die SphK2-Variante bzw. ihr langes N-terminales Fragment endogen in Säugerzellen exprimiert wird, wurde eine RT-PCR mit cDNA aus HEK-293-, HL-60- und N1E115-Zellen durchgeführt (Abb. 7). Tatsächlich wurde in allen drei Zelltypen nicht nur ein Fragment der von Liu *et al.* (2000) publizierten SphK2-Sequenz amplifiziert (jeweils Bahn a), sondern auch das N-terminale Fragment allein (Bahn c) sowie ein überlappendes Fragment (Bahn b). Auch die Expression der C-Terminus-Variante konnte mittels RT-PCR festgestellt werden (Bahn f). Ein sehr langes Fragment (Bahn d) bzw. die volle Sequenz (Bahn e) wurde allerdings hauptsächlich in HL-60-Zellen amplifiziert, was sich durch die Länge der Fragmente erklären läßt. Folglich wird die SphK2-Variante in allen drei humanen Zelllinien auf mRNA-Ebene endogen exprimiert (Abb. 7).

Abb. 4:

1	CGG	ACG	CGT	GGG	AAA	GGA	GGA	GGC	AGA	ATC	CGG	GCA	GAG	GGC	AGG	GAG	48
49	AGG	GCC	TGT	GGG	GAA	GGG	ACC	TCA	GTC	CTG	CTC	CCA	CCC	GCT	CCC	TGG	96
97	AGA	GCA	GGC	GGC	CAG	ACA	CCC	AGG	TCA	GTG	CTC	AGG	GAC	CAG	CTC	TTG	144
145	GCC	CCT	GCC	CCT	TGC	AGG	CGC	TCG	CAT	GTG	GCT	CCT	CTC	GGA	CCC	CGT	192
193	AGT	CCC	TGT	CAT	ATC	CCT	TCT	CTC	CAG	CTG	TCT	CCA	TGC	CTG	CCT	CGT	240
241	ACC	CCT	CCT	ATT	TGC	TCT	CCC	TTC	CAC	TCT	GTC	TTG	CCT	TTC	TCG	TTG	288
289	GGG	TGA	AAA	AGT	CTT	ACT	CTC	TTA	AGT	ATC	TTT	CAT	CGC	CTG	AGT	TTC	336
337	ACC	TCA	TTG	ACC	CTG	TTT	GTC	TCC	TCT	CAG	TGT	TTC	TCT	GGC	TCT	CAG	384
385	ACC	CTA	TCT	CTA	TTG	CGT	TTG	TGA	TTG	TTT	TGC	TGT	TTT	ACC	CAC	TGC	432
433	ACC	GTA	TGG	GGG	GTG	GGG	GTG	TCG	GGG	AGG	TGT	GTC	TTT	CAG	TCT	TTG	480
481	CAT	GTC	TGT	TTC	TGC	ATA	TCC	AAT	CCC	ACT	ATC	CAT	TCC	CCT	TCC	TGT	528
529	GCC	TTC	TTT	TCC	CCC	AAA	GCC	CGT	TAT	CAT	CAC	CCA	ACC	ACC	TGT	ATA	576
577	TTT	CAA	TCC	TTT	CTC	TTG	TTT	ATC	TAT	TCC	TAT	GAA	GGC	AAG	GAT	TTG	624
625	GGG	CTA	TTT	TGT	CTC	CTG	CTG	TGT	TTG	CTA	GGC	CTA	GCA	CCG	TGA	TTG	672
673	GCA	CAT	AAA	GGG	TAC	TGA	ATA	CTT	ACT	GGG	GAA	<u>TAA</u>	<u>ATG</u>	<u>ATT</u>	<u>GGA</u>	<u>TGT</u>	720
												M					
721	<u>TTG</u>	<u>CAT</u>	<u>GCC</u>	<u>CGG</u>	<u>GTC</u>	TCC	GGC	CCC	CTC	TGG	GAT	GCT	GGC	CTC	TGT	CCC	768
	RA10 →			KD5 →													
769	GCA	TCC	TCA	AGG	TCT	GCC	CAC	ACC	TGT	CTG	AGC	CTG	TCT	GTC	TCT	GAT	816
817	GCT	CCT	GTC	TCA	CCT	GCC	ACT	GCC	CCT	CAT	TGT	CTC	CTC	CTG	TCC	ACA	864
865	GCC	CCT	GCC	CCT	CCC	TGC	CCC	TGC	CAT	GGG	GTC	CTG	AAT	TCT	CAC	CCC	912
913	TTC	TCT	CCT	CCC	TTC	CCA	CAG	AGG	CCA	GAC	CAG	GAG	CTG	ACC	GGG	AGC	960
961	TGG	GGC	CAC	GGG	CCT	AGG	AGC	ACC	CTG	GTC	AGG	GCT	AAG	<u>GCC</u>	<u>ATG</u>	<u>GCC</u>	1008
1009	<u>CCG</u>	<u>CCC</u>	<u>CCA</u>	<u>CCG</u>	<u>CCA</u>	<u>CTG</u>	GCT	GCC	AGC	ACC	CCG	CTC	CTC	CAT	<u>GGC</u>	<u>GAG</u>	1056
	MZH1 →			KD4 →													
1057	<u>TTT</u>	<u>GGC</u>	<u>TCC</u>	<u>TAC</u>	<u>CCA</u>	GCC	CGA	GGC	CCA	CGC	TTT	GCC	CTC	ACC	CTT	ACA	1104
	RA7 ←																
1105	TCG	CAG	GCC	CTG	CAC	ATA	CAG	CGG	CTG	CGC	CCC	AAA	CCT	GAA	GCC	AGG	1152
1153	CCC	CGG	GGT	GGC	CTG	GTC	CCG	TTG	GCC	GAG	GTC	TCA	GGC	TGC	TGC	ACC	1200
1201	CTG	CGA	AGC	CGC	AGC	CCC	TCA	GAC	TCA	GCG	GCC	TAC	TTC	TGC	ATC	TAC	1248
1249	ACC	TAC	CCT	CGG	GGC	CGG	CGC	GGG	GCC	CGG	CGC	AGA	GCC	ACT	CGC	ACC	1296
1297	TTC	CGG	GCA	GAT	GGG	GCC	GCC	ACC	TAC	GAA	GAG	AAC	CGT	GCC	GAG	GCC	1344
1345	CAG	CGC	TGG	GCC	ACT	GCC	CTC	ACC	TGT	CTG	CTC	CGA	GGA	CTG	CCA	CTG	1392
1393	CCC	GGG	GAT	GGG	GAG	ATC	ACC	CCT	GAC	CTG	CTA	CCT	CGG	CCG	CCC	CGG	1440
1441	TTG	CTT	CTA	TTG	GTC	AAT	CCC	TTT	GGG	GGT	CGG	GGC	CTG	GCC	TGG	CAG	1488
1489	TGG	TGT	AAG	AAC	CAC	GTG	CTT	CCC	ATG	ATC	TCT	GAA	GCT	GGG	CTG	TCC	1536
1537	TTC	AAC	CTC	ATC	CAG	ACA	GAA	CGA	CAG	AAC	CAC	GCC	CGG	GAG	CTG	GTC	1584

1585	CAG GGG CTG AGC CTG AGT GAG TGG GAT GGC ATC GTC ACG GTC TCG GGA	1632
1633	GAC GGG CTG CTC CAT GAG GTG CTG AAC GGG CTC CTA GAT CGC CCT GAC	1680
1681	TGG GAG GAA GCT GTG AAG ATG CCT GTG GGC ATC CTC CCC TGC GGC TCG	1728
1729	GGC AAC GCG CTG GCC GGA GCA GTG AAC CAG CAC GGG GGA TTT GAG CCA	1776
1777	GCC CTG GGC CTC GAC CTG TTG CTC AAC TGC TCA CTG TTG CTG TGC CGG	1824
1825	GGT GGT GGC CAC CCA CTG GAC CTG CTC TCC GTG ACG CTG GCC TCG GGC	1872
1873	TCC CGC TGT TTC TCC TTC CTG TCT GTG GCC TGG GGC TTC GTG TCA GAT	1920
1921	GTG GAT ATC CAG AGC GAG CGC TTC AGG GCC TTG GGC AGT GCC <u>CGC TTC</u>	1968
1969	<u>ACA CTG GGC ACG GTG</u> CTG GGC CTC GCC ACA CTG CAC ACC TAC CGC GGA	2016
	RA5 ←	
2017	CGC CTC TCC TAC CTC CCC GCC ACT GTG GAA CCT GCC TCG CCC ACC CCT	2064
2065	GCC CAT AGC CTG CCT CGT GCC AAG TCG GAG CTG ACC CTA ACC CCA GAC	2112
2113	CCA GCC CCG CCC ATG GCC CAC TCA CCC CTG CAT CGT TCT GTG TCT GAC	2160
2161	CTG CCT CTT CCC CTG CCC CAG CCT GCC CTG GCC TCT CCT GGC TCG CCA	2208
2209	GAA CCC CTG CCC ATC CTG TCC CTC AAC GGT GGG GGC CCA GAG CTG GCT	2256
2257	GGG GAC TGG GGT GGG GCT GGG GAT GCT CCG CTG TCC CCG GAC CCA CTG	2304
2305	CTG TCT TCA CCT CCT GGC TCT CCC AAG GCA GCT CTA CAC TCA CCC GTC	2352
2353	TCC GAA GGG GCC CCC GTA ATT CCC CCA TCC TCT GGG CTC CCA CTT CCC	2400
2401	ACC CCT GAT GCC CGG GTA GGG GCC TCC ACC TGC GGC CCG CCC GAC CAC	2448
2449	CTG CTG CCT CCG CTG GGC ACC CCG CTG CCC CCA GAC TGG GTG ACG CTG	2496
2497	GAG GGG GAC TTT GTG CTC ATG TTG GCC ATC TCG CCC AGC CAC CTA GGC	2544
2545	GCT GAC CTG GTG GCA GCT CCG CAT GCG CGC TTC GAC <u>GAC GGC CTG GTG</u>	2592
	RA20 →	
2593	<u>CAC CTG TGC</u> TGG GTG CGT AGC GGC ATC TCG CGG GCT GCG CTG CTG CGC	2640
2641	CTT TTC TTG GCC ATG GAG CGT GGT AGC CAC TTC AGC CTG GGC TGT CCG	2688
2689	CAG CTG GGC TAC GCC GCG GCC CGT GCC TTC CGC CTA GAG CCG CTC ACA	2736
2737	CCA CGC GGC GTG CTC ACA GTG GAC GGG GAG CAG GTG GAG TAT GGG CCG	2784
2785	CTA CAG GCA CAG ATG CAC CCT GGC ATC GCC CGC GGG AGG ACT CAG ACT	2832
2833	CCA GCA CTT CCA GCA GCG CCT GCC CTC TAT GGA CGA CAG CCC GGA GCT	2880
2881	GCC CAC GGG CTG CAG CCA GTA TGC CAG GGA GCT GCC CTC TTC TTC CAC	2928
2929	AAC AGC TGG CTC TGG GGT TCT CAA GAT TTA TTC AGG ATC GTG TTA <u>ACG</u>	2976
2977	<u>GAG GCG GTG GGA GGA TAG GGT</u> CCC TGA <u>CGT GCC GGG GAC</u> ACA CAC AGA	3024
	KD6 ← RA24 ←	
3025	GAA CCC TCC CCG CCC CCG CAA GGG AGG GGG GAG GCT CGC TTT TTC TTA	3072
3073	AAA ATA TAA ATG TAT TTA TCT GCA AAA AAA AAA AAA AG	3110

Abb. 4) Nukleotidsequenz der in Essen identifizierten humanen SphK2-Variante

Die Nukleotidsequenz der SphK2-Variante wurde in Triplets umgeschrieben. Die jeweiligen Primersequenzen für die RT-PCR sind unterstrichen. Die Primersequenzen, aus denen die 4 Sphingosinkinase-Konstrukte über RT-PCR gewonnen wurden, sind farbig markiert. Die SphK2_{lang}- und SphK2_{kurz}-Startcodons sind fett hervorgehoben. **Zusätzliche BamHI Schnittstelle am 5' Ende des Primers, die im Konstrukt nicht vorhanden ist. Die Pfeile geben die Leserichtung der Primer an.

Abb. 5:

```
NM_020126.3 -----
SphK2_Essen  MIGCLHARVSGPLWDAGLCPASSRSAHTCLSLSVSDAPVSPATAPHCLLLSTAPAPPCPC

NM_020126.3  --MNGHLEAEEQQDQRPDQELTGSWGHGPRSTLVRAKAMAPPPPLAASTPLLHGEFGSY
SphK2_Essen  HGVLNSHPFSPFPQRPDQELTGSWGHGPRSTLVRAKAMAPPPPLAASTPLLHGEFGSY
              : .                *****

NM_020126.3  PARGPRFALTTLTSQALHIQRLRPKPEARPRGGLVPLAEVSGCCTLRSRSPSDSAAAYFCIY
SphK2_Essen  PARGPRFALTTLTSQALHIQRLRPKPEARPRGGLVPLAEVSGCCTLRSRSPSDSAAAYFCIY
              *****

NM_020126.3  TYPRGRRGARRRATRTFRADGAATYEENRAEAQRWATALTCLLRGLPLPGDGEITPDLLP
SphK2_Essen  TYPRGRRGARRRATRTFRADGAATYEENRAEAQRWATALTCLLRGLPLPGDGEITPDLLP
              *****

NM_020126.3  RPPRLLLLVNPFGGRLAWQWCKNHVLP MISEAGLSFNLIQTERQNHARELVQGLSLSEW
SphK2_Essen  RPPRLLLLVNPFGGRLAWQWCKNHVLP MISEAGLSFNLIQTERQNHARELVQGLSLSEW
              *****

NM_020126.3  DGIIVTVSGDGLLHEVLNGLLDRPDWEEAVKMPVGILPCGSGNALAGAVNQHGGEFAPALGL
SphK2_Essen  DGIIVTVSGDGLLHEVLNGLLDRPDWEEAVKMPVGILPCGSGNALAGAVNQHGGEFAPALGL
              *****

NM_020126.3  DLLNCSLLLCRGGGHPLDLLSVTLASGSRCSFSLVAVGFWSDVDI QSERFRALGSARF
SphK2_Essen  DLLNCSLLLCRGGGHPLDLLSVTLASGSRCSFSLVAVGFWSDVDI QSERFRALGSARF
              *****

NM_020126.3  TLGTVLGLATLHTYRGRLSYLPATVEPASPTPAHSLPRAKSELTLTPDPAPPMASPLHR
SphK2_Essen  TLGTVLGLATLHTYRGRLSYLPATVEPASPTPAHSLPRAKSELTLTPDPAPPMASPLHR
              *****

NM_020126.3  SVSDLPLPLPQPALASPGSPEPLPILSLNGGGPELAGDWGGAGDAPLSPDPLLSSPPGSP
SphK2_Essen  SVSDLPLPLPQPALASPGSPEPLPILSLNGGGPELAGDWGGAGDAPLSPDPLLSSPPGSP
              *****

NM_020126.3  KAALHSPVSEGAPVIPSSGLPLPTPDARVGASTCGPPDHLLPPLGTPLPPDWVTEGDF
SphK2_Essen  KAALHSPVSEGAPVIPSSGLPLPTPDARVGASTCGPPDHLLPPLGTPLPPDWVTEGDF
              *****

NM_020126.3  VLMLAISP SHLGADLVAAPHARFDDGLVHLCWVRSGISRALLRLFLAMERGS HFSLGCP
SphK2_Essen  VLMLAISP SHLGADLVAAPHARFDDGLVHLCWVRSGISRALLRLFLAMERGS HFSLGCP
              *****

NM_020126.3  QLG YAAARA FRLEPLTPRGVLTVDGEQVEYGPLQAQMHPGIGTLLTGPPGCPGREG ---
SphK2_Essen  QLG YAAARA FRLEPLTPRGVLTVDGEQVEYGPLQAQMHPGIGTLLTGPPGCPGREG ---
              *****
              * . * . * .

NM_020126.3 -----
SphK2_Essen  QPGAAHGLQPVCGAALFFHNSWLWGSQDLFRIVLTEAVGG
```

Abb. 5) Vergleich der SphK-Variante (SphK2_Essen) mit der in der Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) veröffentlichten humanen SphK2-Sequenz (Genbank-Nr. NM_020126.3).

Die Aminosäuresequenzen beider Proteine wurden mit ClustalW verglichen (www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html). Die ursprünglich publizierte SphK2-Sequenz (Liu

et al., 2000) beginnt mit MAPPPPP und ist rot dargestellt. Später wurde von anderen Autoren eine N-terminale Verlängerung gefunden (blau dargestellt).

Abb. 6:

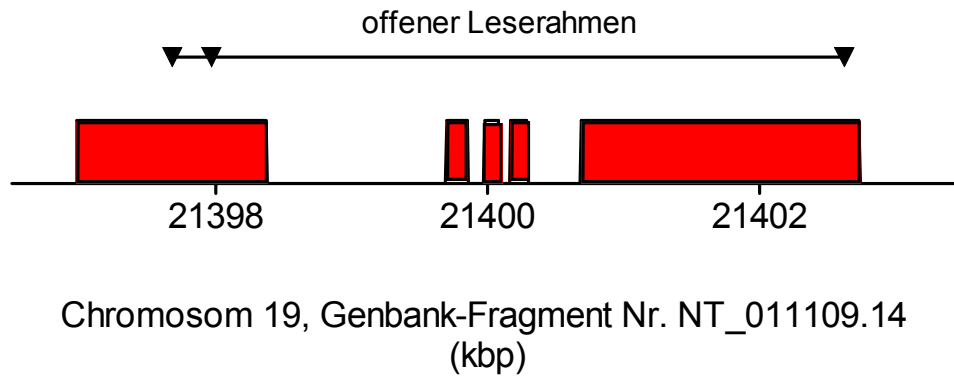


Abb. 6) Vollständige Lage der SphK2-Variante auf dem Chromosom 19.

Die Nukleotidsequenz der SphK2-Variante (Abb. 4) wurde mit dem Genbank-Fragment Nr. NT_011109.14 des Chromosoms 19 verglichen. Die vollständige Sequenz fand sich auf diesem Fragment in fünf Exons (rote Balken). Der offene Leserahmen mit den beiden Startcodons und dem Stopcodon sind ebenfalls eingezeichnet (▼).

Abb. 7:

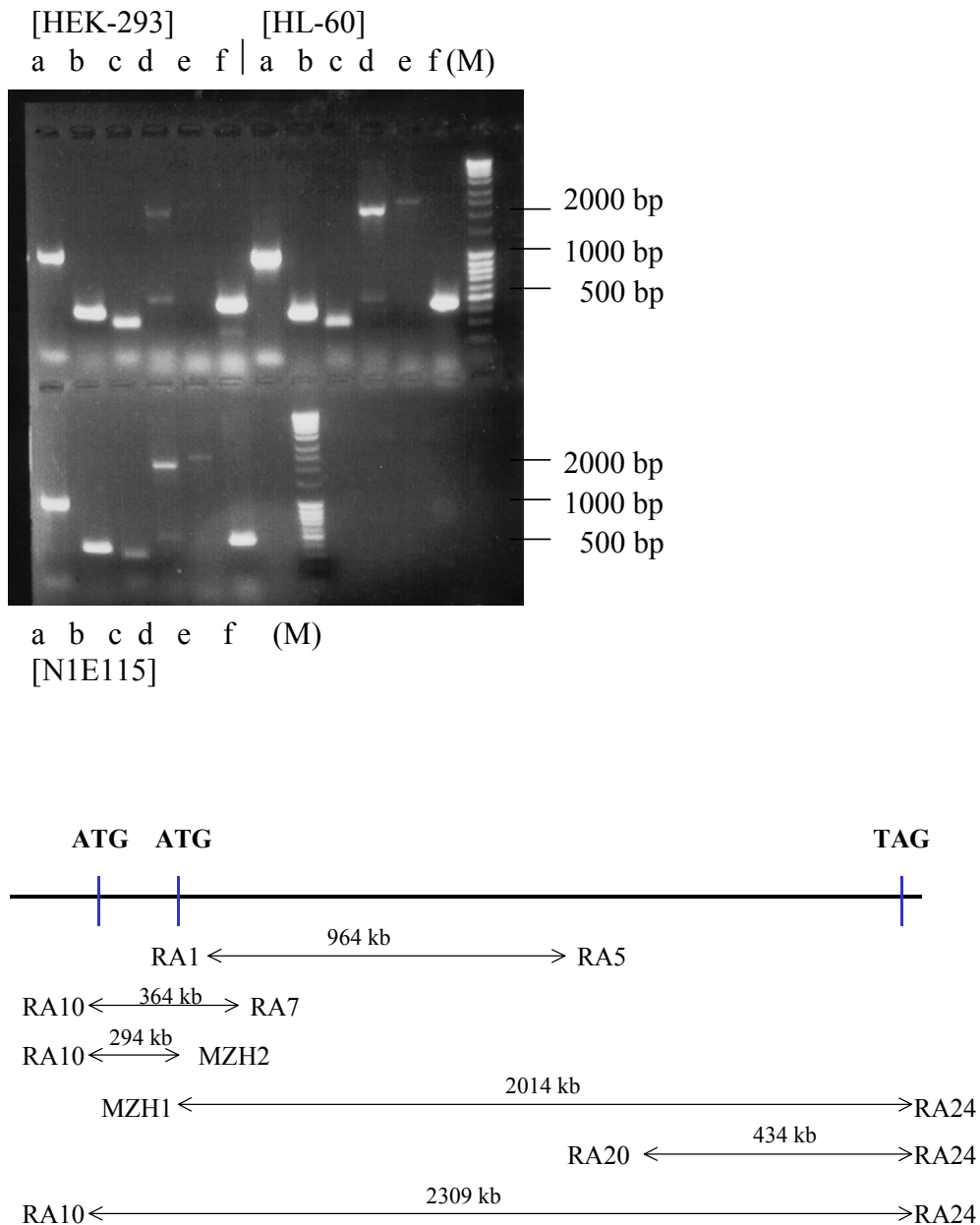


Abb. 7) RT-PCR mit cDNA aus HEK-293-, HL-60- und N1E115-Zellen zum Nachweis der endogenen SphK2-Expression

Die mRNA wurde aus den Zellen präpariert und über Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation erfolgte über RT-PCR mit den angegebenen *Forward*- und *Reverse*-Primern. Die amplifizierten Sequenzen sind im unteren Teil der Abb. 7 dargestellt.

a] RA1/RA5; b] RA10/RA7; c] RA10/MZH2; d] MZH1/RA24; e] RA10/RA24; f] RA20/RA24;
(M) DNA-Größenstandard

Um die SphK2-Variante exprimieren und charakterisieren zu können, war es erforderlich, sie in einen eukaryontischen Expressionsvektor umzuklonieren. Dazu wurde das gesamte Konstrukt in einen mit BamHI und SalI restringierten pCMV3b-Vektor kloniert. Durch diesen Vektor wird ein myc-Epitop an das Protein angehängt, das einen Nachweis mit einem anti-myc-Antikörper ermöglicht. Nach einer Transfektion von Säugerzellen mit diesem Konstrukt konnte jedoch weder im Westernblot noch mittels Immunfärbung der Zellen eine Expression des SphK2-Proteins beobachtet werden (nicht gezeigt).

Um die SphK2-Variante dennoch exprimieren zu können, wurden die überschüssigen, nicht translatierten C- und N-terminalen Enden entfernt. Außerdem wurde zusätzlich zur SphK2-Variante, welche wie oben beschrieben, ein langes N-terminales Fragment besitzt, eine kürzere Variante des Proteins konstruiert, welche am zweiten Leserahmen beginnt. Dazu wurden aus dem SphK2-pCMV3b-Plasmid über eine RT-PCR mit dem Primerpaar KD5/KD6 die SphK2_{lang}, und mit dem Primerpaar KD4/KD6 die SphK2_{kurz} gewonnen. Die Lage der Primer ist in Abb. 4 markiert.

Die PCR-Produkte SphK2_{lang} (2285 bp) und SphK2_{kurz} (1991 bp) wurden in den Klonierungsvektor pEGEMTMTeasy ligiert und anschließend in einen mit NotI restringierten, dephosphorylierten pcDNA3_{myc}-Vektor kloniert.

Für die spätere Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen in lebenden Zellen wurden außerdem die Sequenzen von SphK1a, SphK2_{lang} (KD5/KD6) und SphK2_{kurz} (KD4/KD6) in einen mit BamHI und XbaI restringierten pEYFP-C1-Vektor kloniert. Durch diesen Vektor wird N-terminal das gelbe fluoreszierende Protein (YFP) an die Proteine gekoppelt.

Schließlich wurden die Konstrukte von SphK1, SphK2_{kurz} und SphK2_{lang}, jeweils im pcDNA3-Vektor oder pEYFP-C1-Vektor, in HEK-293-Zellen transfiziert und ihre Expression im Westernblot überprüft. Wie in Abb. 8 gezeigt, wurden SphK1-YFP, SphK2_{kurz}-YFP und das freie YFP deutlich exprimiert, SphK2_{lang}-YFP jedoch nicht. Von den pcDNA3-Konstrukten wurde die SphK1 gut exprimiert, die SphK2_{kurz} jedoch deutlich schlechter (Abb. 8). Die SphK1 bildete ein SDS-resistentes Dimer (Abb. 8). Eine Expression der SphK2_{lang} im pcDNA-Vektor konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Abb. 8:

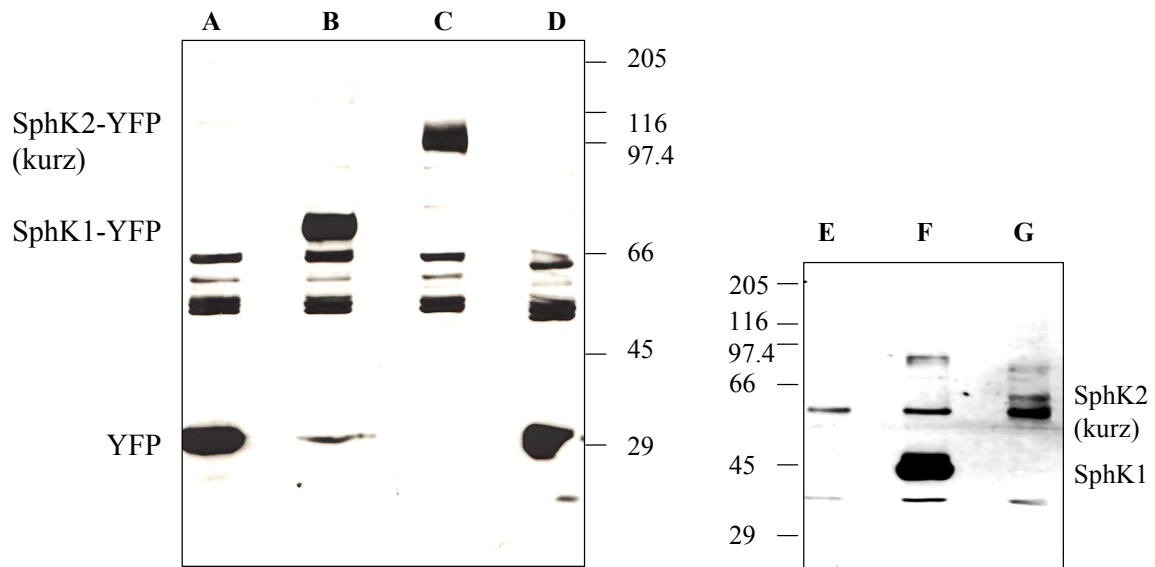


Abb. 8) Expression von SphK1 und SphK2 in HEK-293-Zellen

Für den Protein-Nachweis wurden Lysate von HEK-293-Zellen verwendet. Die Sphingosinkinasen und die jeweiligen Vektoren wurden in diesen Zellen überexprimiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion erfolgte mit den Antikörpern gegen YFP (Bahn A-D) und myc (Bahn E-G).

A] YFP (27 kDa); B] SphK1-YFP (69 kDa); C] SphK2_{kurz}-YFP (97 kDa); D] SphK_{lang}-YFP (107 kDa); E] pcDNA3_{myc}; F] SphK1-pcDNA3_{myc} (42 kDa); G] SphK2-pcDNA3_{myc} (70 kDa)

Die Aktivität der Sphingosinkinasen wurde nach transienter Transfektion in HEK-293-Zellen gemessen. Überexpression der SphK1 führte, wie in der Literatur beschrieben, zu einer massiven Steigerung der S1P-Produktion in HEK-293-Zellen (nicht gezeigt). Überexpression der SphK2_{kurz} in HEK-293-Zellen dagegen verursachte kaum eine signifikante Steigerung der S1P-Bildung (nicht gezeigt). Wenn jedoch das SphK2_{kurz}-YFP-Fusionsprotein überexprimiert wurde, konnte ein deutlicher Anstieg der S1P-Bildung beobachtet werden (Abb. 9). Wie die Westernblots in Abb. 8 zeigen, wird das SphK2_{kurz}-YFP-Fusionsprotein offenbar sehr viel stärker exprimiert als die SphK2_{kurz} allein und ist vermutlich stabiler. Um zu überprüfen, ob das SphK1-YFP-Fusionsprotein ebenfalls funktionell aktiv war, wurde auch seine Aktivität untersucht. SphK1-YFP steigerte die S1P-Bildung in ähnlichem Ausmaß wie die SPK2_{kurz}-YFP (Abb. 9). Beide Fusionsproteine waren also funktionell aktiv.

Abb. 9:

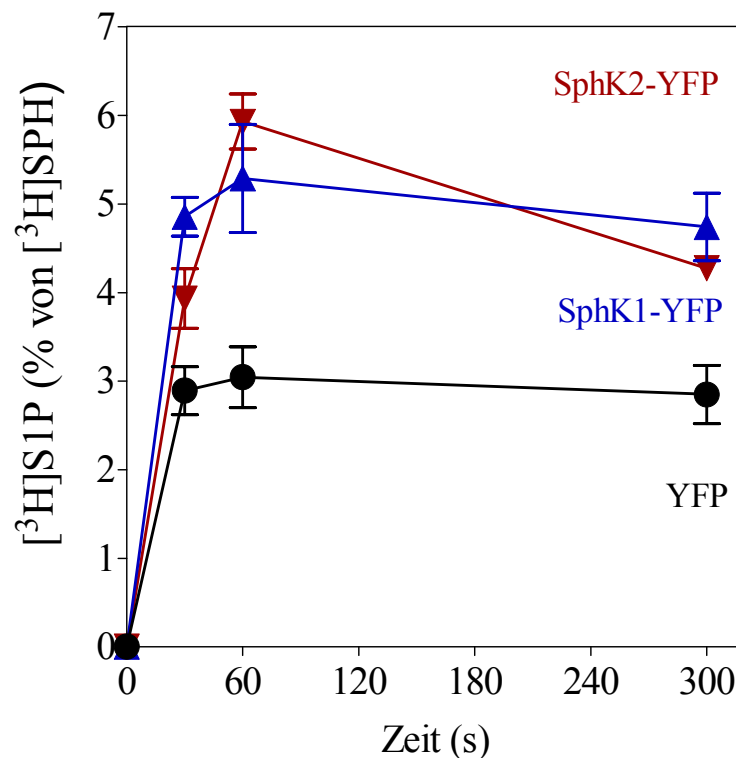


Abb. 9) Basale Aktivität der YFP-gekoppelten Sphingosinkinasen

HEK-293-Zellen wurden transient mit YFP, SphK1-YFP oder SphK2_{kurz}-YFP (SphK2-YFP) transfiziert und mit $[^3\text{H}]$ Sphingosin inkubiert. Die Reaktion wurde zu den angegebenen Zeiten gestoppt. Die Auftrennung von Sphingosin und S1P erfolgte über eine Dünnschichtchromatographie auf TLC-Platten. Die Banden wurden entnommen und der $[^3\text{H}]\text{S1P}$ - und $[^3\text{H}]\text{Sphingosin}$ -Gehalt mit einem Szintillationszähler bestimmt.

Da also die lange Version der SphK2-Variante nicht exprimiert werden konnte, wurde in weiteren Experimenten stets die SphK2_{kurz} verwendet. Dies Protein wird im Folgenden stets als SphK2 bezeichnet, da es sich nur im C-Terminus von der von Liu *et al.* (2000) beschriebenen SphK2 unterscheidet.

4.3. Einfluß von SphK1 und SphK2 auf $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung

4.3.1. Einfluß von SphK1 und SphK2 auf $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen

Intrazelluläres S1P spielt eine Rolle bei der Ca^{2+} -Mobilisierung durch Membranrezeptoren (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a; Young *et al.*, 2001; Melendez und Khaw, 2002). In HEK-293-Zellen ist die Sphingosinkinase an der Stimulation von $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen durch die Muskarinrezeptor-Subtypen M_2 und M_3 , durch endogene S1P-GPCR und durch endogene EGF-Rezeptoren beteiligt, wie Untersuchungen mit Sphingosinkinase-Inhibitoren ergaben (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a; 1999; 2001). Im Fall des M_3 -Rezeptors war die Sphingosinkinase bei submaximalen Agonistkonzentrationen an der Vermittlung des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs beteiligt, während bei maximalen Agonistkonzentrationen hauptsächlich die PLC den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vermittelte (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a). Im Gegensatz dazu wurden die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch die endogenen S1P-GPCR lediglich durch die Sphingosinkinase vermittelt, ohne daß eine Stimulation der PLC nachgewiesen werden konnte (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2001). Es war jedoch nicht bekannt, welche Sphingosinkinase-Isoformen dabei eine Rolle spielen. Deshalb wurde der Einfluß von SphK1 und SphK2 auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch M_3 -Muskarinrezeptoren und S1P-GPCR untersucht.

Die in den folgenden Experimenten verwendeten HEK-293-Zellen exprimierten stabil den M_3 -Muskarinrezeptor. Wie in Abb. 10 gezeigt, wurden die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch den M_3 -Rezeptor und durch S1P-GPCR durch Überexpression einer kleinen Menge SphK1 signifikant gesteigert. Dagegen wurden die durch S1P stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch Überexpression einer größeren Menge SphK1 gehemmt (Abb. 10). Dagegen blieben die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege, die durch Stimulation des M_3 -Muskarinrezeptors mit der maximalen Agonistkonzentration von 1 mM Carbachol induziert worden waren, unbeeinflusst (Abb. 10). Während also eine geringe Erhöhung der Sphingosinkinase-Aktivität die Rezeptor-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege verstärkte, hatte eine starke Erhöhung der Sphingosinkinase-Aktivität eine Hemmung zur Folge. Diese Wirkung kann beispielsweise auf einer Verarmung der Zellen an Sphingosin beruhen (Olivera *et al.*, 1999). Die ausschließlich durch die Sphingosinkinase vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch S1P-GPCR waren entsprechend gehemmt, während die bei maximaler Stimulation durch PLC vermittelten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch den M_3 -Rezeptor

unbeeinflusst blieben. Nach Stimulation mit 1 mM Carbachol wurden die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch den M_3 -Rezeptor auch nicht durch Sphingosinkinase-Inhibitoren gehemmt (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a).

Abb. 10:

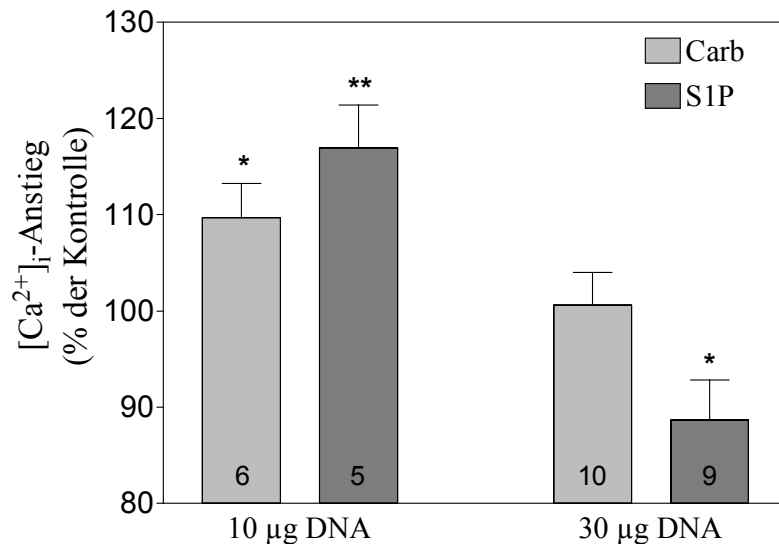


Abb. 10) Einfluß der SphK1-Überexpression auf GPCR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit SphK1 oder pcDNA3-Vektor (je 10 µg bzw. 30 µg DNA pro 145 cm² Zellkulturschale) transfiziert. Die Messungen erfolgten am zweiten oder dritten Tag nach der Transfektion. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden mit 1 mM Carbachol (Carb) oder 1 µM S1P stimuliert. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in den SphK1-transfizierten Zellen sind als % der Vektor-Kontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E.M.; die Zahl der Experimente ist jeweils in den Balken angegeben. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$

Um den Einfluß der SphK2 zu untersuchen, wurde das YFP-gekoppelte Protein verwendet, da es in HEK-293-Zellen besser exprimiert wurde (siehe 4.2.). Überexpression der SphK2-YFP hatte keinen Einfluß auf die basale $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration in HEK-293-Zellen (Abb. 11). Ähnlich wie im Fall der SphK1 führte eine Expression der SphK2 zur signifikanten Hemmung der durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (Abb. 11). Hier war eine kleine, aber

nicht signifikante Hemmung auch des durch den M₃ mACh-Rezeptor stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs zu beobachten (Abb. 11).

Abb. 11:

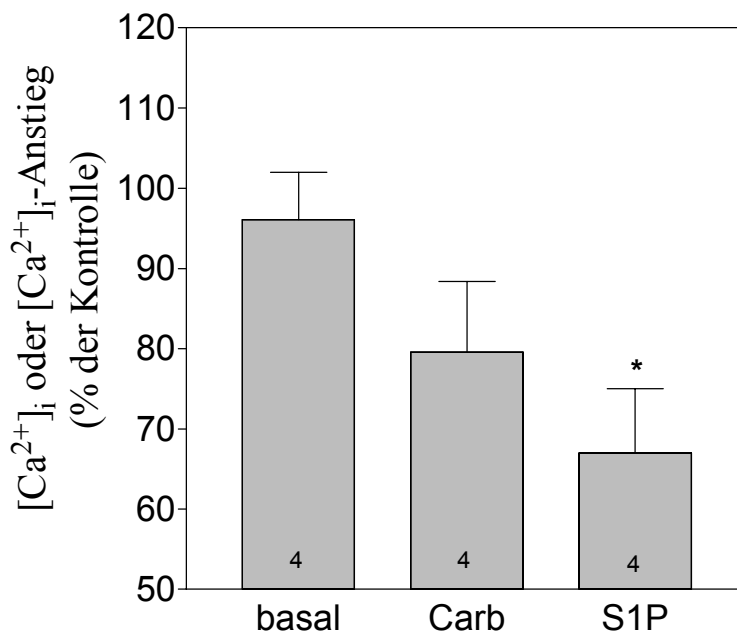


Abb. 11) Einfluß der SphK2-Überexpression auf GPCR-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit SphK2-YFP oder YFP (je 50 µg DNA pro 145 cm² Zellkulturschale) transfiziert. Die Messungen erfolgten am zweiten oder dritten Tag nach der Transfektion. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden mit 1 mM Carbachol (Carb) oder 1 µM S1P stimuliert. Die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in den SphK2-YFP-transfizierten Zellen sind als % der Vektor-Kontrolle dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E.M.; die Zahl der Experimente ist jeweils in den Balken angegeben. * $P < 0,05$

4.3.2. Einfluß von SphK1 und SphK2 auf $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung in PC12-Zellen

Wie schon unter 4.1. dargestellt, stimulieren die in PC12-Zellen endogen exprimierten Bradykinin-Rezeptoren die S1P-Produktion, und das durch Sphingosinkinase gebildete S1P ist an der Vermittlung der Bradykinin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege beteiligt (Lass, 2000; Alemany *et al.*, 2001). Interessanterweise wird die S1P-Bildung in PC12-Zellen auch durch Depolarisation stimuliert (Alemany *et al.*, 2001). Da bei der Depolarisation Ca^{2+} durch Spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Zellen strömt, wird in diesem Fall die Sphingosinkinase durch den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg aktiviert (Alemany *et al.*, 2001). Eine Hemmung der Sphingosinkinase führte wiederum zur Verminderung des durch Depolarisation induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs, weshalb die Hypothese aufgestellt wurde, daß die Sphingosinkinaseaktivität in diesem System ein signalverstärkender Mechanismus ist (Alemany *et al.*, 2001).

Um zu untersuchen, welche Sphingosinkinase-Isoformen am durch Bradykinin oder KCl-Depolarisation induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg beteiligt sind, wurden SphK1 und SphK2 in PC12-Zellen transient und stabil überexprimiert.

Wie in Abb. 12 gezeigt, bewirkte die transiente Überexpression der SphK1 eine Verstärkung der durch KCl induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Die durch den Bradykinin-Rezeptor stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden jedoch durch die SphK1-Überexpression nicht beeinflusst (Abb. 12). Auch in stabil transfizierten PC12-Zellen wurden durch die SphK1 die durch KCl-Depolarisation stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege gesteigert, während die Wirkung von Bradykinin unverändert blieb (Abb. 13). Durch stabile Expression der SphK2 jedoch wurden sowohl die durch Bradykinin als auch die durch KCl-Depolarisation induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege signifikant erhöht (Abb. 13).

Abb. 12:

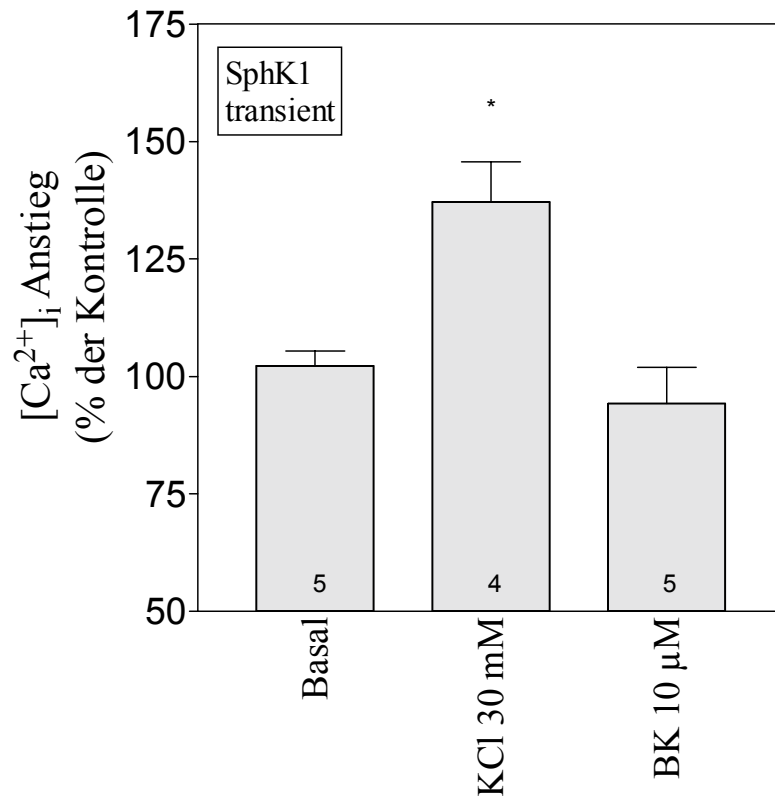


Abb. 12) [Ca²⁺]_i-Anstiege in mit SphK1 transient transfizierten PC12-Zellen

Die Zellen wurden mit je 100 µg SphK1 oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Die Messungen erfolgten am 3. Tag nach der Transfektion. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden mit KCl oder Bradykinin (BK) stimuliert.

Gezeigt sind Mittelwerte ± S.E.M.; die Zahl der Experimente ist jeweils in den Balken angegeben.

* $P < 0,05$

Abb. 13:

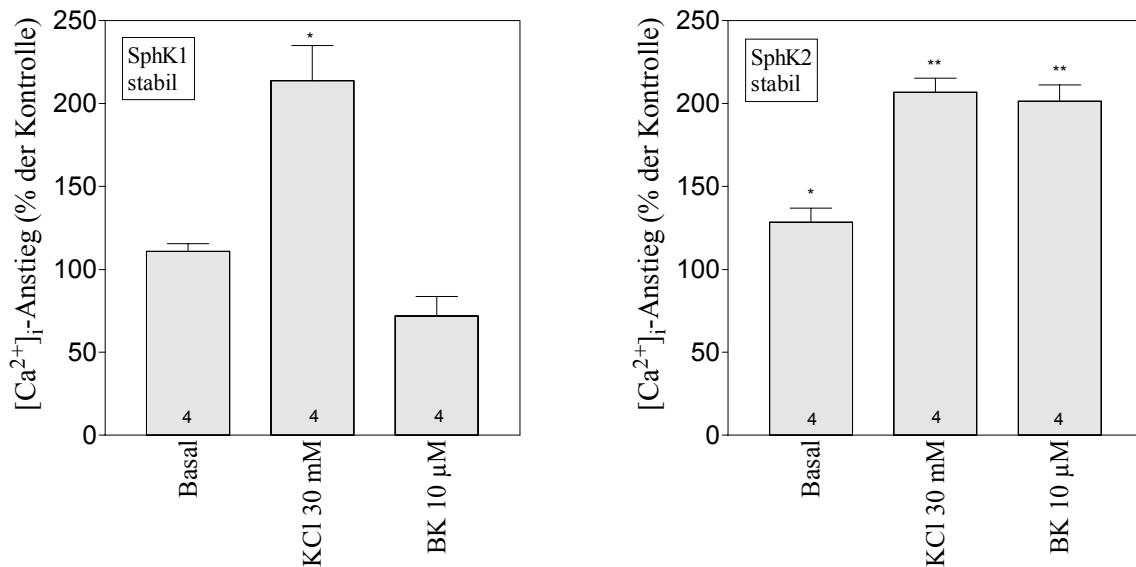


Abb. 13) [Ca²⁺]_i-Anstiege in SphK1 oder SphK2 stabil exprimierenden PC12-Zellen

Die stabil transfizierten Zellen wurden einen Tag vor der Messung mit G418-freiem Medium behandelt. Die mit Fura-2 beladenen Zellen wurden mit KCl oder Bradykinin (BK) stimuliert. Zum Vergleich dienten Zellen, die mit dem pcDNA3-Vektor stabil transfiziert worden waren. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.E.M.; die Zahl der Experimente ist jeweils in den Balken angegeben. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Schließlich wurde an PC12-Zellen der Einfluß der Sphingosinkinase-Isoformen auf den Ca²⁺-abhängigen Prozeß der Noradrenalin-Freisetzung untersucht. Eine transiente Überexpression der SphK1 führte zur signifikanten Steigerung der durch 60 mM KCl stimulierten Noradrenalin-Freisetzung (Abb. 14). In die SphK1 stabil exprimierenden PC12-Zellen war im Vergleich zu den Vektor-transfizierten Zellen die basale Noradrenalin-Freisetzung leicht, aber nicht signifikant erhöht (Abb. 15). Wie in den transient transfizierten Zellen war auch in den stabil transfizierten Zellen die durch 60 mM KCl stimulierte Noradrenalin-Freisetzung signifikant erhöht, während die Wirkung von Bradykinin unverändert blieb. In die SphK2 stabil exprimierenden PC12-Zellen war hauptsächlich die durch Bradykinin stimulierte Noradrenalin-Freisetzung signifikant verstärkt (Abb. 15). Die durch KCl-Depolarisation stimulierte Noradrenalin-Freisetzung war lediglich bei kleinen KCl-Konzentrationen (20 mM) gesteigert, während die Wirkung von höheren KCl-Konzentrationen (60 mM) unverändert blieb (Abb. 15).

Die Wirkung beider Sphingosinkinase-Isoformen auf die Freisetzung von Noradrenalin entsprach folglich der Wirkung auf die Bradykinin- und KCl-stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und kann also auf sie zurückgeführt werden. Zusammenfassend fällt auf, daß die SphK1 nur die durch Depolarisation stimulierten Zellreaktionen beeinflusste, während die SphK2 außerdem einen Einfluß auf die durch Bradykinin stimulierten Vorgänge hatte.

Abb. 14:

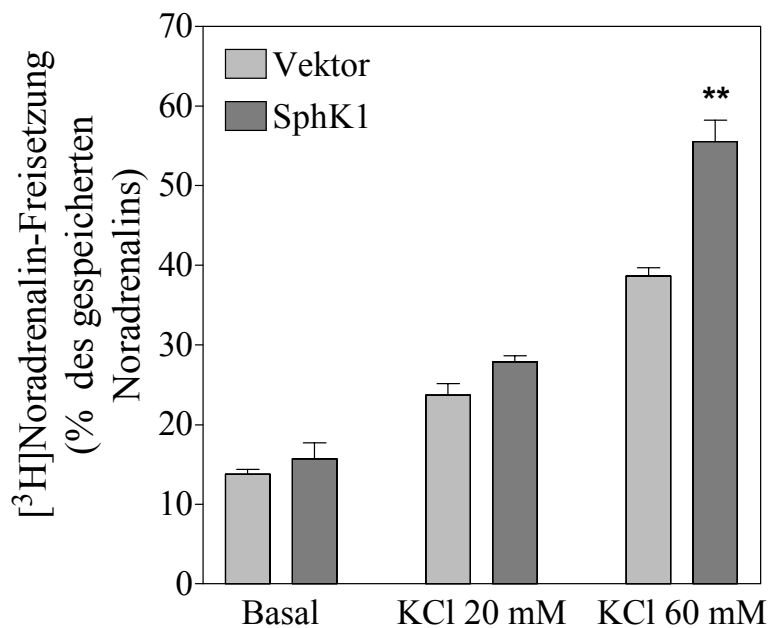


Abb. 14) Noradrenalin-Freisetzung von mit SphK1 transient transfizierten PC12-Zellen

Die PC12-Zellen wurden mit 100 μ g SphK1 oder pcDNA3-Vektor transfiziert. Die Messung erfolgte am 3. Tag nach der Transfektion. Die mit $[^3H]$ Noradrenalin beladenen Zellen wurden mit 20 mM oder 60 mM KCl für 10 min stimuliert. Anschließend wurde das freigesetzte und das zellgebundene $[^3H]$ Noradrenalin bestimmt.

Das freigesetzte Noradrenalin ist als % des gesamten gespeicherten Noradrenalins (= freigesetztes + zellgebundenes Noradrenalin) dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm S.D. aus einem repräsentativen Experiment, das in 3-fach Bestimmungen durchgeführt worden waren. ** $P < 0,01$

Abb. 15:

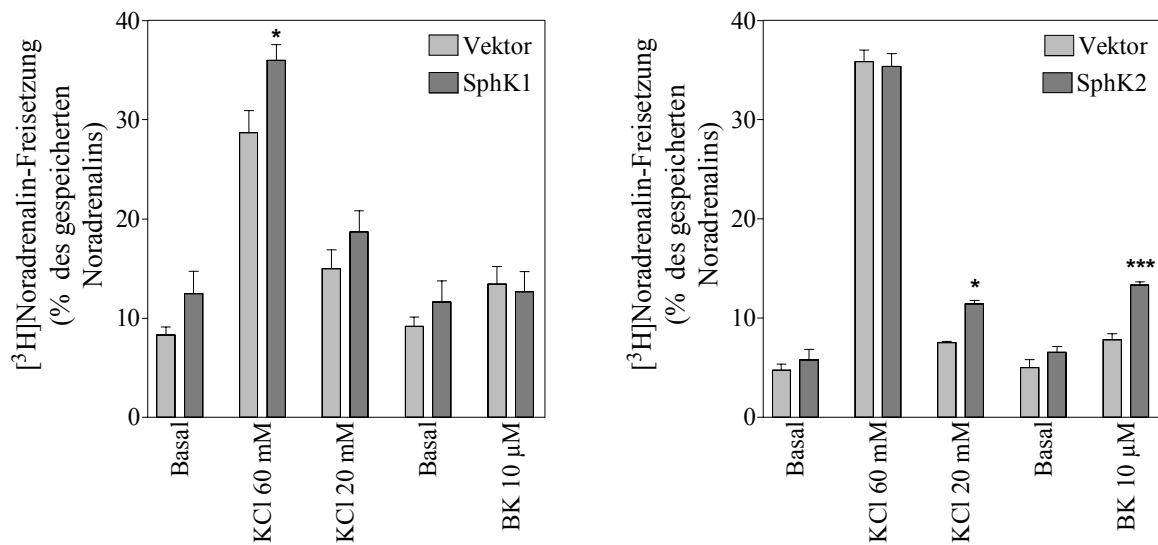


Abb. 15) Noradrenalin-Freisetzung an mit SphK1 und SphK2 stabil transfizierten PC12-Zellen

Die stabil transfizierten Zellen wurden einen Tag vor den Messungen mit G418-freiem Medium behandelt. Die mit [³H]Noradrenalin beladenen Zellen wurden mit KCl oder Bradykinin (BK) stimuliert. Anschließend wurden das freigesetzte und das zellgebundene [³H]Noradrenalin bestimmt.

Das freigesetzte Noradrenalin ist als % des gesamten gespeicherten Noradrenalins (= freigesetztes + zellgebundenes Noradrenalin) dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte ± S.E.M. aus je 6 (SphK1) bzw. 3-4 (SphK2) Experimenten. * $P < 0,05$ *** $P < 0,001$

4.4. Subzelluläre Lokalisation und Translokation der Sphingosinkinase-Isoformen

Es ist bekannt, daß die SphK1 sowohl eine cytosolische als auch eine membranassoziierte Aktivität aufweist, obwohl in ihrer Gensequenz keine membranspannenden Domänen gefunden wurden (Kohama *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu besitzt die SphK2 mindestens vier hypothetische transmembrane Domänen (Spiegel und Milstien, 2002).

Um die Lokalisation der Sphingosinkinasen in der Zelle zu untersuchen, wurden die mit dem YFP gekoppelten Sphingosinkinasen in HEK-293- und PC12-Zellen überexprimiert. Die YFP-gekoppelten Sphingosinkinasen konnten in lebenden Zellen beobachtet werden. Die Beobachtungen wurden mit einem Licht- oder einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt.

4.4.1. Subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen in HEK-293-Zellen

Nach der Expression in stabil den M₃-Muskarinrezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen fand sich das freie YFP im Cytosol und im Zellkern (Abb. 16). SphK1-YFP und SphK2-YFP waren dagegen cytosolisch lokalisiert und nicht im Kern zu finden. Die SphK1-YFP war dabei nicht homogen verteilt, sondern bildete Aggregate. Zum Teil war die SphK1-YFP auch an der Membran zu finden. Die SphK2-YFP war homogen im Cytosol verteilt und fand sich trotz ihrer vier putativen transmembranären Domänen nicht an der Membran (Abb. 16).

Abb. 16:

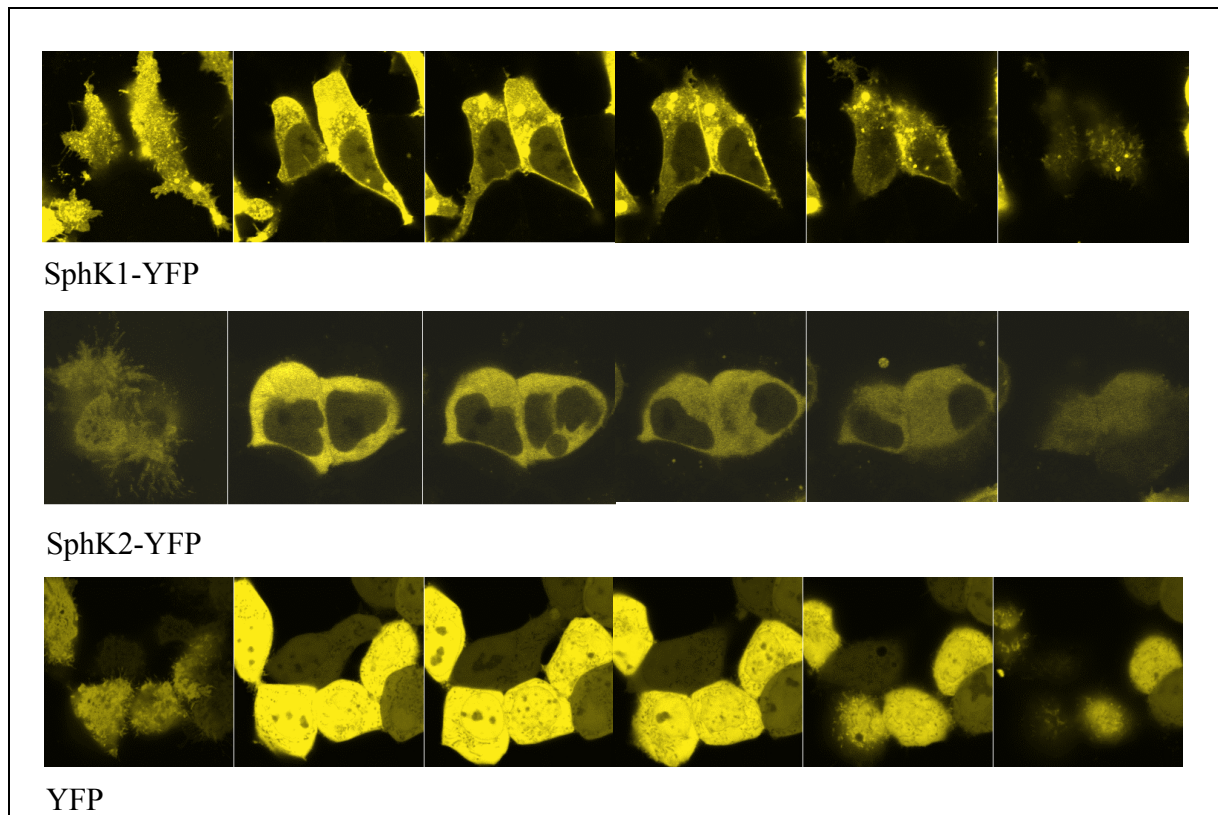


Abb. 16) Lokalisation des YFP-Proteins und der YFP-gekoppelten Sphingosinkinasen in stabil den M₃-Muskarinrezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit YFP, SphK1-YFP und SphK2-YFP (je 50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Die Bildserien wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop angefertigt und stellen Stapel von Bildschnitten durch die Zellen dar. Es wurden insgesamt sechs Schnittebenen durch die Zellen gelegt, wobei die Bildserien von links nach rechts die Schnittebenen von unten nach oben darstellen.

4.4.2. Einfluß verschiedener Agonisten auf die subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen in HEK-293-Zellen

In den folgenden Experimenten wurden wiederum HEK-293-Zellen verwendet, welche stabil den M₃-Muskarinrezeptor exprimieren. Nach der Stimulation des M₃-Rezeptors

mit Carbachol (10 μ M-1 mM) translozierte die SphK1 vom Cytosol zur Plasmamembran (Abb. 17). Dagegen verursachten die Agonisten S1P, Thrombin, EGF sowie der PKC-Aktivator PMA keine Translokation (Abb. 17). Die durch Carbachol stimulierte Translokation setzte bereits nach wenigen Sekunden ein und war nach 30-60 sec abgeschlossen (Abb. 18). Sie konnte mit dem Muskarinrezeptor-Antagonisten Atropin komplett blockiert werden (Abb. 19).

Abb. 17:

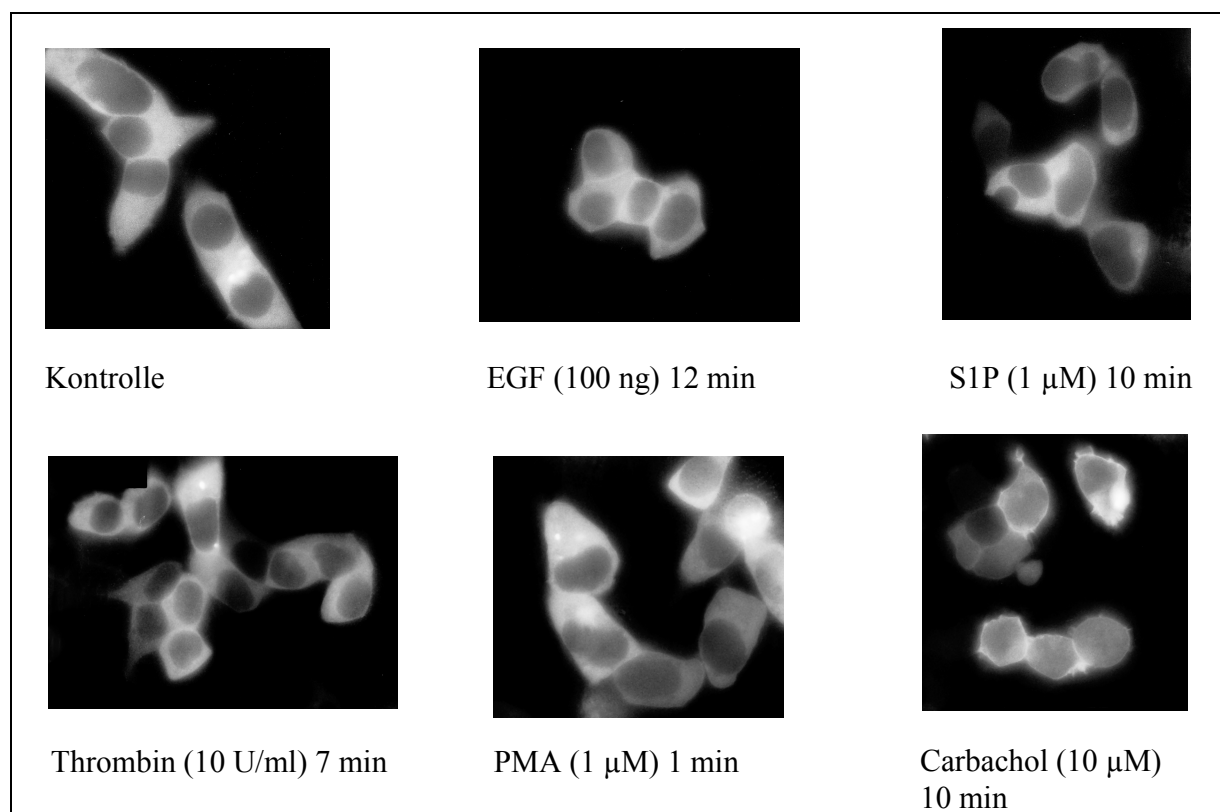


Abb. 17) Einfluß verschiedener Agonisten auf die Lokalisation der SphK1 in stabil den M₃-Muskarinrezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit SphK1-YFP (50 μ g DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transient transfiziert. Im Versuch wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und für die angegebenen Zeiten mit verschiedenen Agonisten bzw. PMA stimuliert. Die hier gezeigten Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop gewonnen. Wegen der erforderlichen langen Belichtungszeiten und dem Ausbleichen der Fluoreszenz wurde jedes Mal ein anderes Gesichtsfeld fotografiert.

Abb. 18:

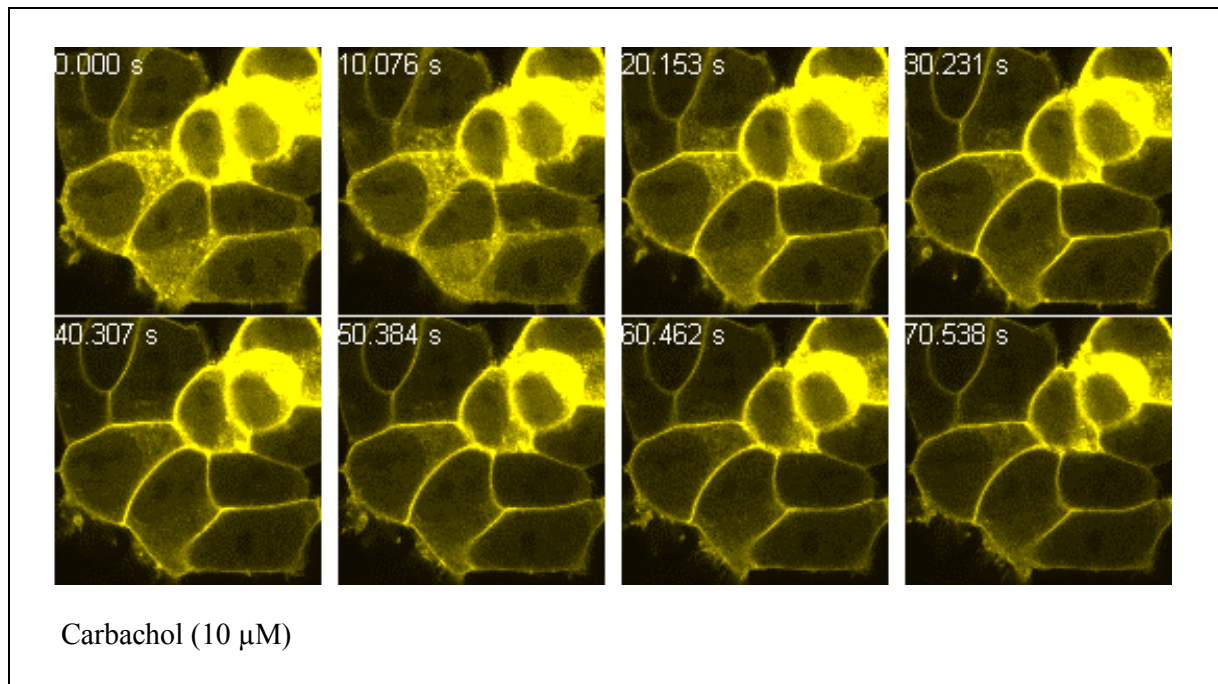


Abb. 18) Zeitverlauf der durch Carbachol induzierten SphK1-Translokation in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit SphK1-YFP (50 μ g DNA pro 145 cm^2 -Kulturschale) transfiziert. Die hier gezeigte Bildserie ist ein mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommener Zeitverlauf. Die Zeitintervalle sind auf jedem Bild oben links dargestellt und beginnen mit dem Start des Experimentes. ▼ Zugabe von Carbachol

Abb. 19:

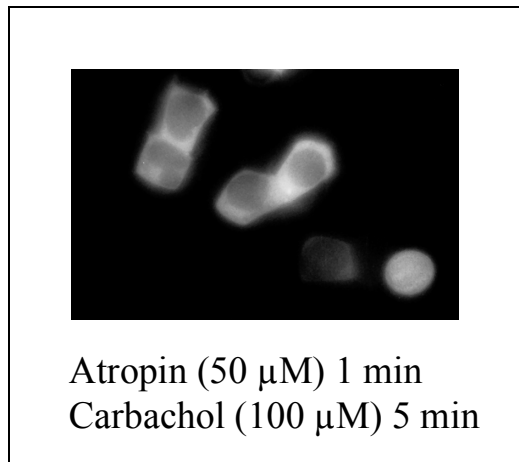


Abb. 19) Hemmung der durch Carbachol stimulierten SphK1-Translokation durch Blockierung des M₃-Muskarinrezeptors

Die Zellen wurden mit SphK1-YFP (50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Gemessen wurde die Translokation am 3. Tag nach der Transfektion, indem die Zellen mit Atropin für die angegebene Zeit vorbehandelt wurden. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops wurde die Translokation vor bzw. nach Stimulation mit Carbachol (100 µM) untersucht.

Um den Einfluß weiterer Rezeptoren auf das Translokationsverhalten der SphK1 zu ermitteln, wurden der PDGFβ-Rezeptor und der B₂-Rezeptor mit SphK1 co-transfiziert.

Es ist bekannt, daß PDGF in *Airway smooth muscle*-Zellen die Sphingosinkinase-Aktivität stimuliert (Pyne *et al.*, 1996). Desweiteren ist gezeigt worden, daß PDGF in Fibroblasten die SphK1-Translokation zur Membran induziert (Rosenfeldt *et al.*, 2001). In mit SphK1 und PDGFβ-Rezeptor co-transfizierten HEK-293-Zellen konnte mit PDGF jedoch keine Translokation der SphK1 ausgelöst werden (Abb. 20). Eine nachfolgende Stimulation mit Carbachol löste auch nach der Stimulation mit PDGF eine SphK1-Translokation aus.

Wurden die mit SphK1 und B₂-Rezeptor co-transfizierten HEK-293-Zellen mit Bradykinin stimuliert, translozierte die SphK1 innerhalb weniger Sekunden zur Membran (Abb. 21).

Abb. 20:

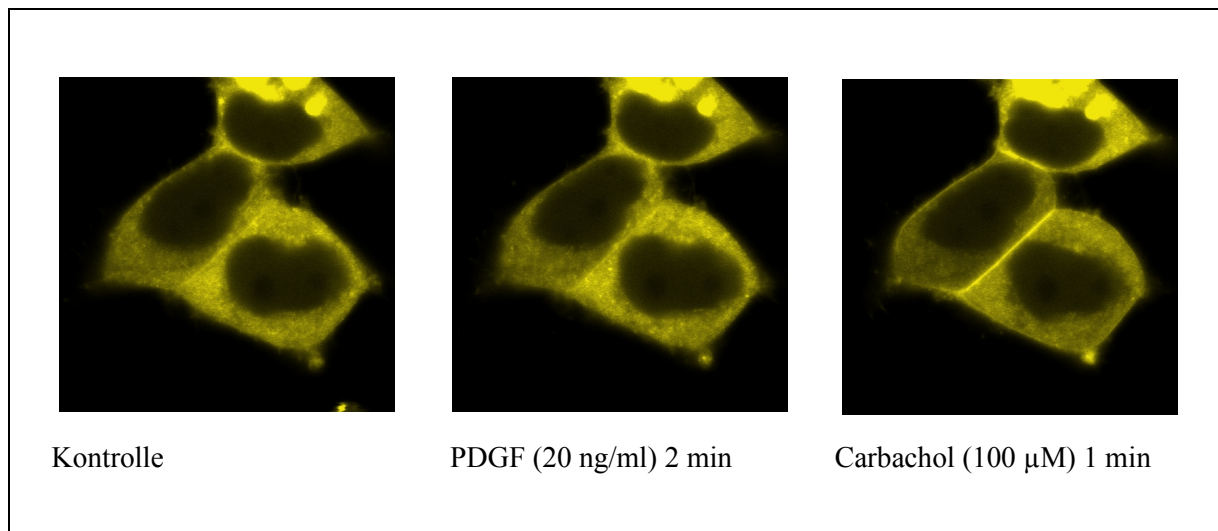


Abb. 20) Einfluß von PDGF auf die Translokation der SphK1 in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit PDGF β -Rezeptor und SphK1-YFP (je 50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) co-transfiziert. Die Translokation wurde am 3. Tag nach der Transfektion am Laserscanning-Mikroskop untersucht. Die Bildserie zeigt Zellen vor und nach der Stimulation mit PDGF und nach der anschließenden Stimulation mit Carbachol. Die Stimulation mit Carbachol nach der Behandlung mit PDGF diente als Positivkontrolle.

Abb. 21:

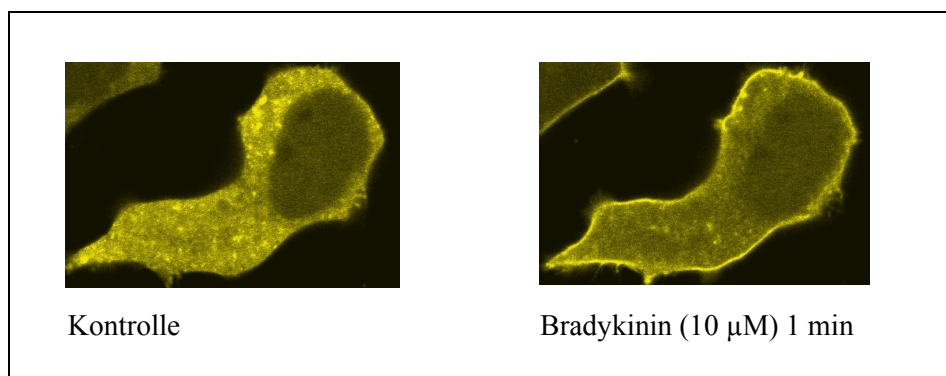


Abb. 21) Einfluß von Bradykinin auf die Translokation der SphK1 in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit dem B₂-Bradykininrezeptor und SphK1-YFP (je 50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) co-transfiziert. Die Translokation wurde am 3. Tag nach der Transfektion

unter einem Laserscanning-Mikroskop untersucht. Gezeigt ist eine Zelle vor und nach der Stimulation mit Bradykinin.

Im Gegensatz zur SphK1-YFP blieb die subzelluläre Lokalisation der SphK2-YFP nach Stimulation des M_3 -Rezeptors mit Carbachol unverändert (Abb. 22). Auch nach Stimulation der PKC mit PMA oder nach Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$ mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin änderte die SphK2-YFP nicht ihre Lokalisation (Abb. 22).

Abb. 22:

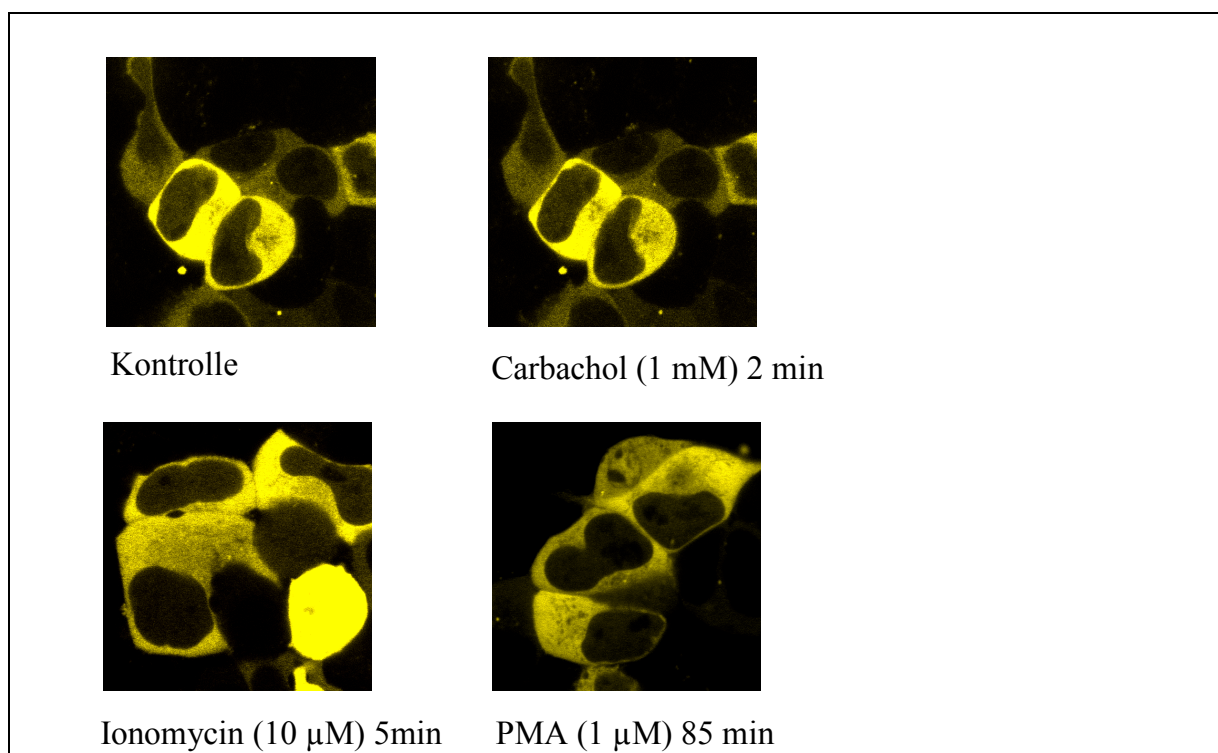


Abb. 22) Einfluß verschiedener Stimuli auf die Lokalisation der SphK2 in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit SphK2-YFP (50 μ g DNA pro 145 cm^2 -Kulturschale) transfiziert. Im Versuch wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit verschiedenen Stimuli behandelt. Die oberen zwei Bilder zeigen Zellen vor und nach der Stimulation mit Carbachol. Unten sind Zellen gezeigt, die jeweils für die angegebenen Zeiten mit Ionomycin oder PMA inkubiert worden waren. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

4.4.3. Wirkung verschiedener Agonisten auf die Lokalisation der SphK1 in stabil den M₂-Muskarinrezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Um zu untersuchen, ob außer dem M₃-Rezeptor auch der M₂-Rezeptor in der Lage war, eine Membrantranslokation der SphK1 zu induzieren, wurden HEK-293-Zellen verwendet, welche stabil den M₂-Rezeptor exprimieren. Diese Zellen wurden wiederum mit SphK1 transfiziert und mit verschiedenen Agonisten behandelt. Eine Stimulation des M₂-Rezeptors mit Carbachol führte im Gegensatz zur Stimulation des M₃-Rezeptors nicht zur Translokation der SphK1 (Abb. 23). Auch eine Stimulation mit Thrombin, EGF oder S1P löste in den M₂-exprimierenden Zellen keine SphK1-Translokation aus (Abb. 23).

Abb. 23:

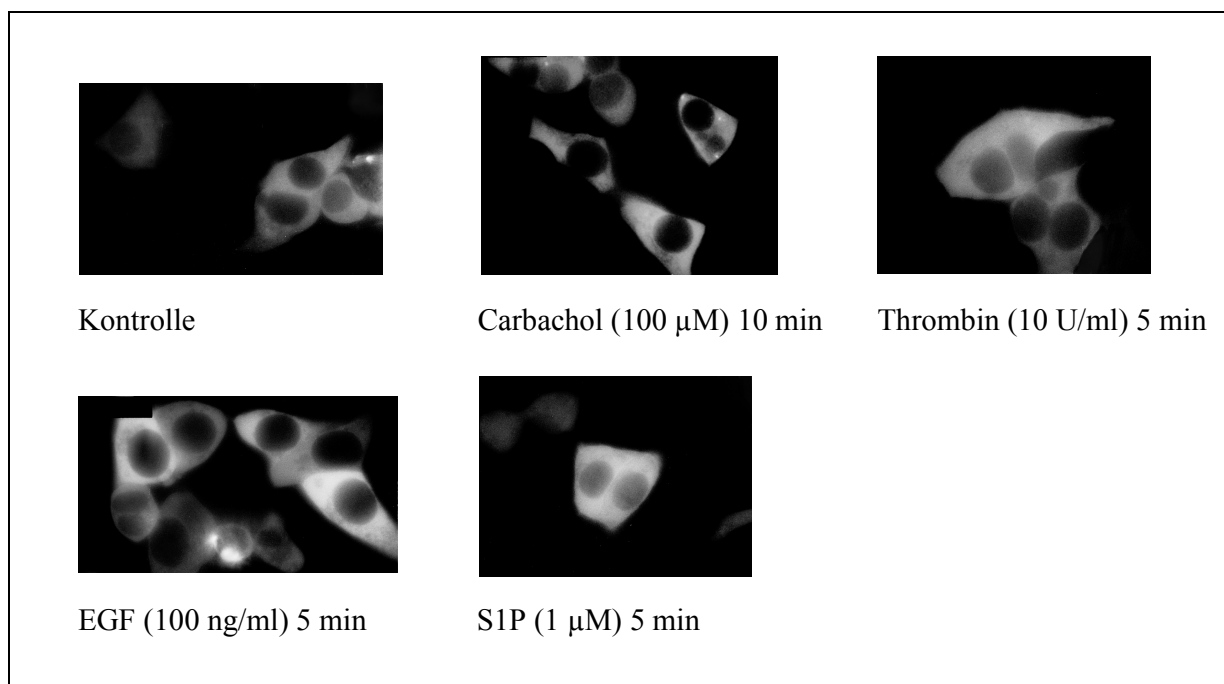


Abb. 23) Einfluß verschiedener Agonisten auf die Lokalisation der SphK1 in stabil den M₂-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit SphK1-YFP (50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Im Versuch wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und für die angegebenen Zeiten mit Carbachol, Thrombin, EGF und S1P behandelt. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

4.4.4. Mechanismus der durch den M₃-Rezeptor induzierten SphK1-Translokation

Da der M₃-Muskarinrezeptor starke Anstiege der $[Ca^{2+}]_i$ induziert (Schmidt *et al.*, 1995), und die SphK1 Bindungstellen für Ca^{2+} /Calmodulin besitzt (Young *et al.*, 2002), lag es nahe, den Einfluß von Ca^{2+} auf die subzelluläre Lokalisation der SphK1 zu untersuchen. Dazu wurden die stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden Zellen mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin oder dem Hemmstoff der SERCA-ATPase Thapsigargin stimuliert. Ionomycin transportiert Ca^{2+} -Ionen frei durch die Plasmamembran, wodurch im Zellinnern die Ca^{2+} -Konzentration der extrazellulären Pufferlösung (HBSS; 1 mM Ca^{2+}) erreicht wird. Thapsigargin hemmt die Wiederaufnahme von Ca^{2+} in das ER, wodurch die Ca^{2+} -Speicher dieses Kompartments entleert werden und in HEK-293-Zellen ein transienter cytosolischer $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg entsteht.

Wie in Abb. 24 gezeigt, hatte die Stimulation der HEK-293-Zellen mit Ionomycin oder Thapsigargin keinen Einfluß auf die Lokalisation der SphK1-YFP. Nach der Inkubation mit Ionomycin oder Thapsigargin war Carbachol immer noch in der Lage, eine Translokation der SphK1 zu induzieren (Abb. 24). Um den durch den M₃-Rezeptor induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg zu hemmen, wurden die Zellen außerdem mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA/AM beladen. Obwohl dies Verfahren die durch den M₃-Rezeptor stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und die S1P-Produktion hemmt (Alemany *et al.*, 2000), induzierte Carbachol auch in den mit BAPTA/AM beladenen Zellen eine Translokation der SphK1 (Abb. 25). Hieraus kann geschlossen werden, daß die durch den M₃-Rezeptor induzierte SphK1-Translokation weder durch den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg noch durch die Entleerung der Ca^{2+} -Speicher vermittelt wird.

Abb. 24:

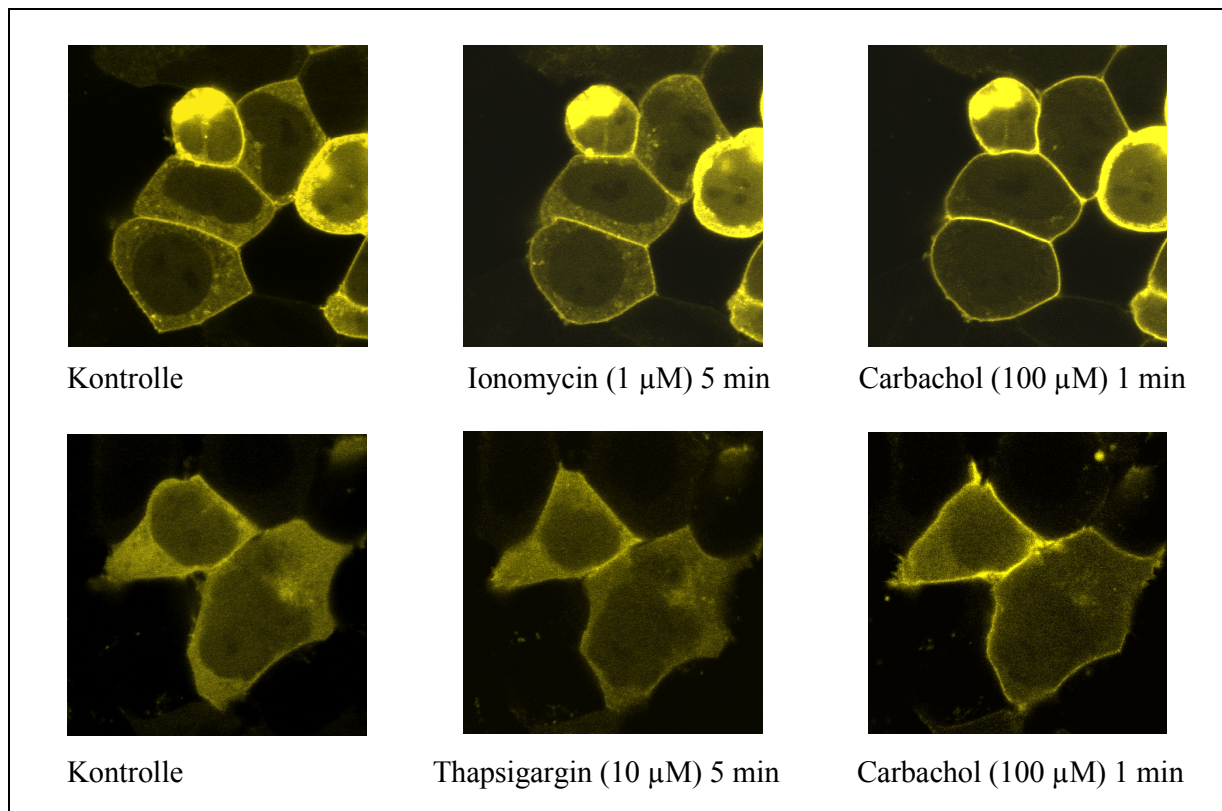


Abb. 24) Einfluß von Ionomycin und Thapsigargin auf die durch Carbachol induzierte SphK1-Translokation in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

Die Zellen wurden mit SphK1-YFP (50 μ g DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. In den zwei Bildserien wird jeweils eine Zellgruppe vor und nach der Inkubation mit Ionomycin oder Thapsigargin gezeigt. Im Anschluß daran wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder wurden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop angefertigt.

Abb. 25:

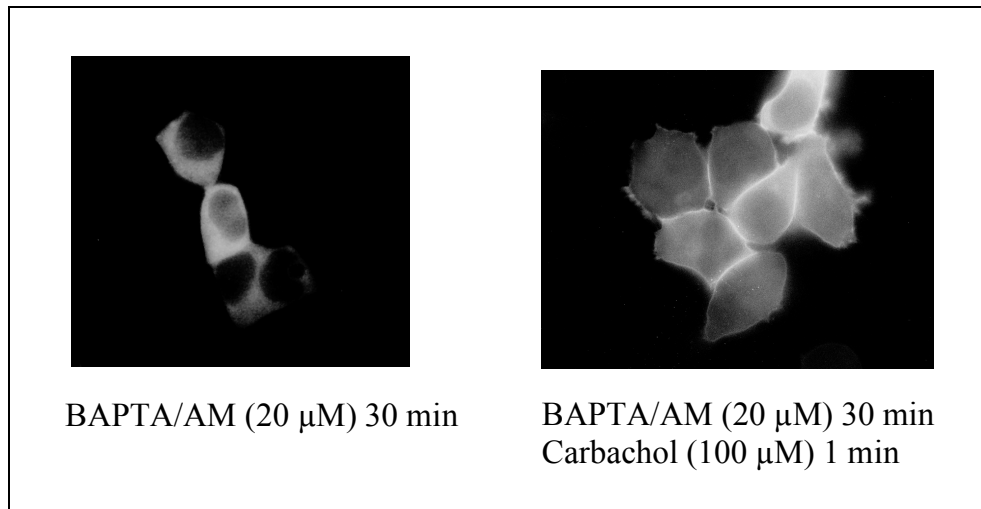


Abb. 25) Einfluß des Ca^{2+} -Chelators BAPTA/AM auf die durch Carbachol induzierte SphK1-Translokation in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit Sphk1-YFP (50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Nach der Vorinkubation mit BAPTA/AM wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Calmodulin-Antagonisten W7 verursachte zunächst eine Rückbildung der spontanen SphK1-Translokation (Abb. 26). Verbunden mit dem Ablösen der SphK1 von der Membran war die Ausbildung von Aggregaten im Cytosol (Abb. 26). Eine anschließende Stimulation mit Carbachol verursachte dennoch eine Translokation der SphK1 zur Membran (Abb. 26).

Abb. 26:

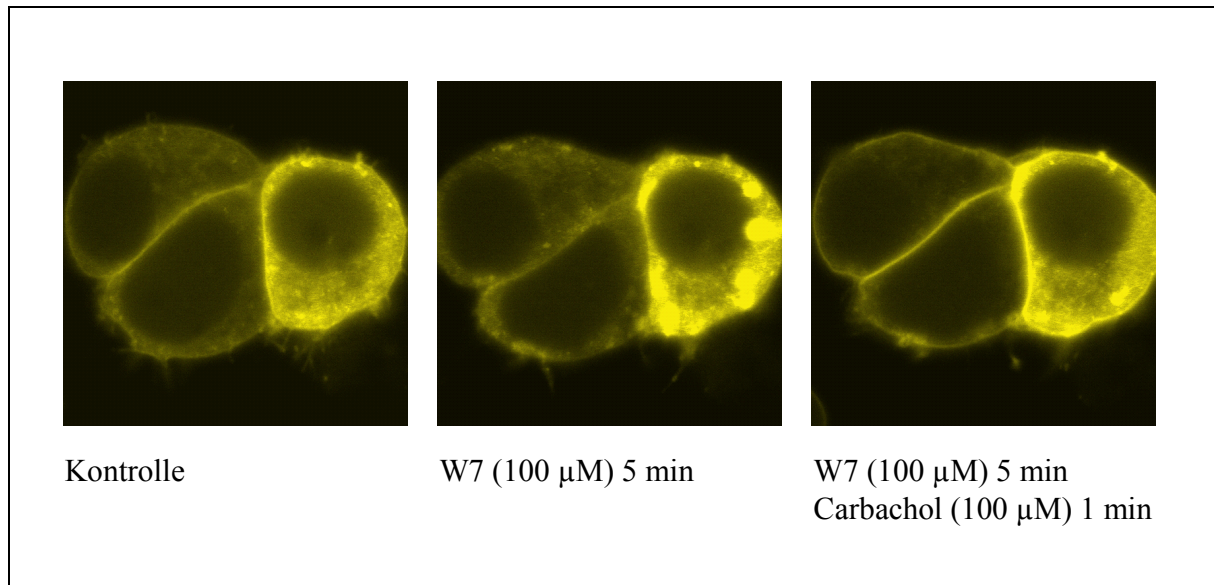


Abb. 26) Einfluß von W7 auf die durch Carbachol induzierte SphK1-YFP-Translokation in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit Sphk1-YFP (50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Nach der Vorinkubation mit W7 wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder wurden mit dem Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

Der M₃-Muskarinrezeptor induziert über die G_q-vermittelte Aktivierung der PLC nicht nur [Ca²⁺]_i-Anstiege, sondern auch eine Stimulation der PKC. Um eine Beteiligung der PKC an der SphK1-Translokation durch den M₃-Rezeptor zu untersuchen, wurde der PKC-Hemmstoff Gö6976 eingesetzt. Nach der Vorbehandlung mit Gö6976 zeigte sich keine Hemmung der durch Carbachol induzierten SphK1-Translokation (Abb. 27).

Abb. 27:

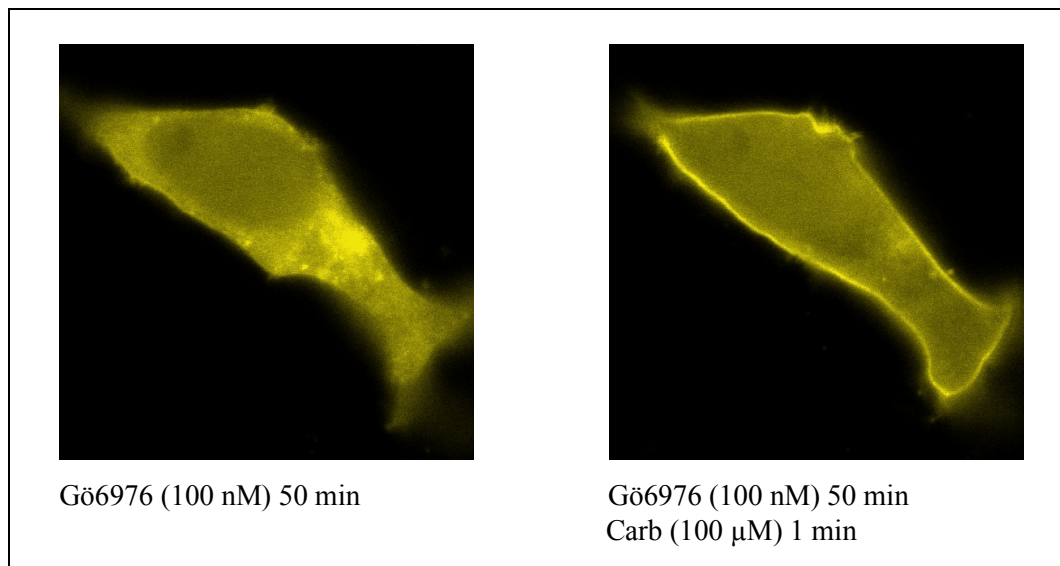


Abb. 27) Einfluß einer Hemmung der PKC auf die durch Carbachol induzierte SphK1-Translokation in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit Sphk1-YFP (50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Die Abbildung zeigt eine Zelle nach der Behandlung mit Gö6976 vor und nach der Stimulation mit Carbachol. Die Bilder wurden an dem Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

Der M₃-Rezeptor stimuliert außerdem die Tyrosinphosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine (Schmidt *et al.*, 1994). Um eine Beteiligung von Tyrosinkinassen an der SphK1-Translokation zu untersuchen, wurde der Tyrosinkinase-Hemmstoff Genistein eingesetzt. Eine Vorbehandlung mit Genistein hemmte jedoch nicht die durch den M₃-Rezeptor induzierte SphK1-Translokation (Abb. 28).

Auch eine Hemmung der Sphingosinkinase-Aktivität durch DMS vermochte nicht die M₃-stimulierte SphK1-Translokation zu blockieren (Abb. 29).

Schließlich wurde der Einfluß des Aktin-Cytoskeletts an der SphK1-Translokation durch den M₃-Rezeptor untersucht. Eine Depolymerisation der Aktinfilamente durch Vorbehandlung mit Cytochalasin B führte jedoch nicht zur Hemmung der durch Carbachol induzierten SphK1-Translokation (Abb. 30).

Abb. 28:

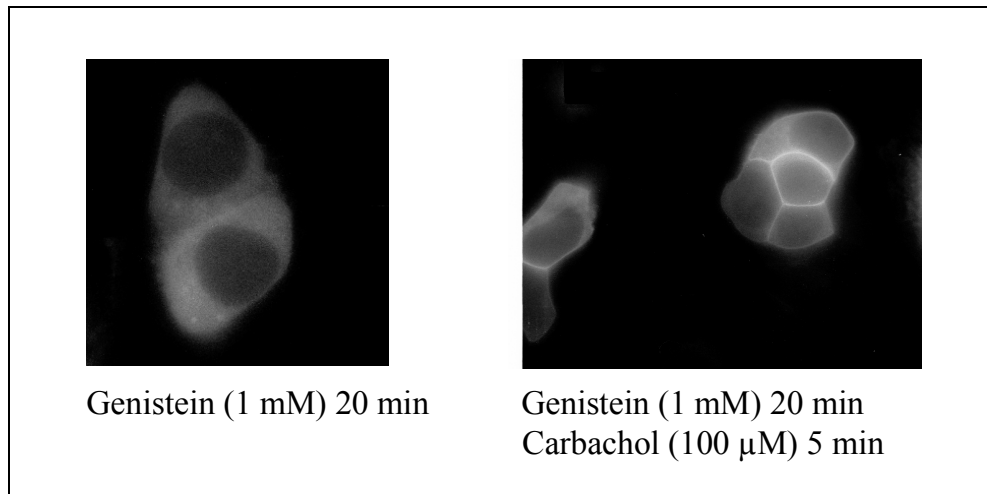


Abb. 28) Einfluß der Hemmung der Tyrosinphosphorylierung auf die durch Carbachol induzierte SphK1-YFP-Translokation in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit Sphk1-YFP (50 μ g DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Nach der Vorinkubation mit Genistein wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

Abb. 29:

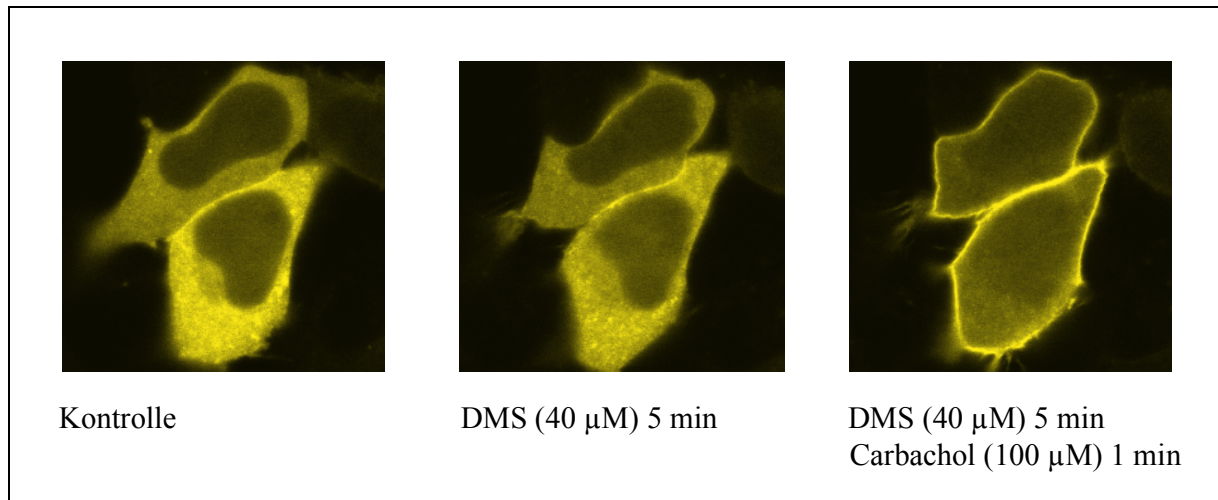


Abb. 29) Einfluß einer Hemmung der Sphingosinkinase-Aktivität auf die durch Carbachol induzierte SphK1-YFP-Translokation in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit Sphk1-YFP (50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Nach der Vorinkubation mit DMS wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder wurden mit einem Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

Abb. 30:

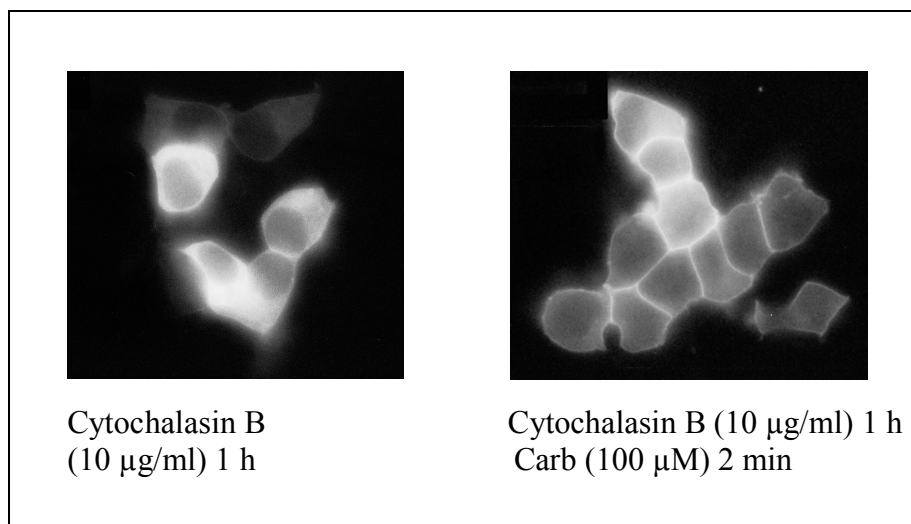


Abb. 30) Einfluß einer Aktin-Depolymerisation auf die durch Carbachol induzierte SphK1-YFP-Translokation in stabil den M₃-Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit SphK1-YFP (50 µg DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Nach der Vorinkubation mit Cytochalasin B wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

4.4.5. G α_q -vermittelte Translokation der SphK1 zur Plasmamembran in HEK-293-Zellen

Während die G_q-gekoppelten M₃-Muskarinrezeptoren und B₂-Bradykininrezeptoren also eine Translokation der SphK1 vom Cytosol an die Plasmamembran induzierten, war eine Reihe weiterer Rezeptoren dazu nicht in der Lage. Inaktiv waren beispielsweise S1P-Rezeptoren, welche in HEK-293-Zellen über G_i-Proteine die Sphingosinkinaseaktivität stimulieren (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2001). Deshalb lag es nahe, eine Beteiligung von G_q-Proteinen an der SphK1-Translokation zu vermuten.

Um zunächst eine mögliche Beteiligung von G_i-Proteinen an der SphK1-Translokation auszuschließen, wurden die mit SphK1-YFP transfizierten HEK-293-Zellen für 24 h mit PTX inkubiert und anschließend der M₃-Rezeptor mit Carbachol stimuliert. Wie in Abb. 31 gezeigt, hatte PTX jedoch keinen Einfluß auf die M₃-stimulierte SphK1-Translokation und folglich wurde diese nicht durch G_i-Proteine vermittelt.

Um den Einfluß von G_q-Proteinen auf die SphK1-Translokation direkt untersuchen zu können, wurden G α_q -Wildtyp und konstitutiv aktives G α_q überexprimiert. Zum Vergleich wurden auch konstitutiv aktive G α_i -Proteine überexprimiert. Wie in Abb. 32 gezeigt, bewirkte die Überexpression von G α_q -Wildtyp eine basale Translokation eines Teils der SphK1, die durch Stimulation mit Carbachol weiter verstärkt wurde. Die Überexpression von konstitutiv aktiven G α_q -Proteinen bewirkte eine massive Translokation der SphK1 an die Plasmamembran, die durch Carbachol nicht weiter verstärkt werden konnte. Dagegen hatte die Überexpression von konstitutiv aktivem G α_i keinen Einfluß auf die Lokalisation der SphK1 (Abb. 32).

Abb. 31:

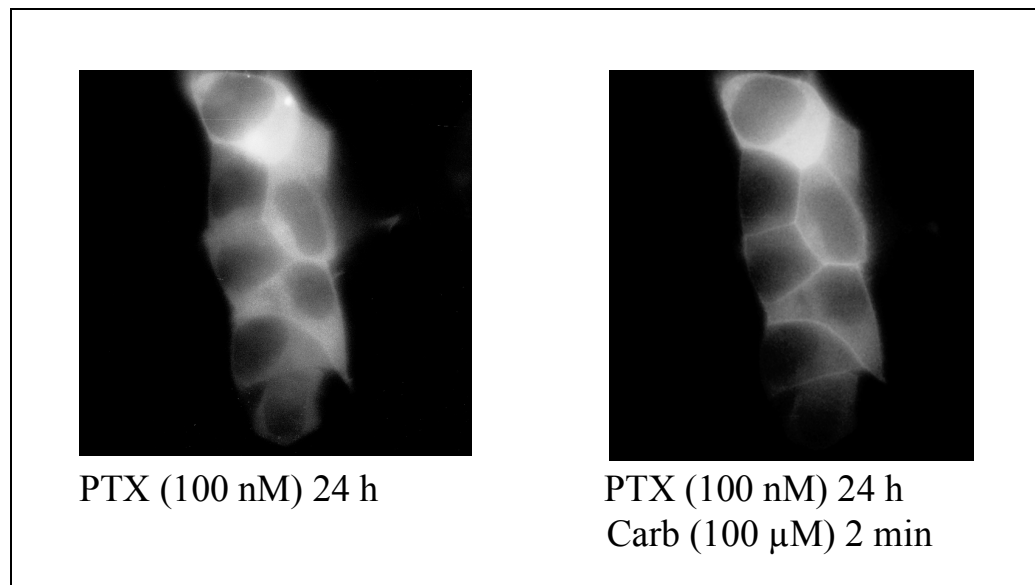


Abb. 31) Einfluß einer Hemmung der G_i -Proteine auf die durch Carbachol induzierte SphK1-YFP-Translokation in stabil den M_3 -Rezeptor exprimierenden HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen wurden mit Sphk1-YFP (50 μ g DNA pro 145 cm²-Kulturschale) transfiziert. Nach der Vorinkubation mit PTX über Nacht wurden die Zellen mit Carbachol stimuliert. Die Bilder wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

Abb. 32:

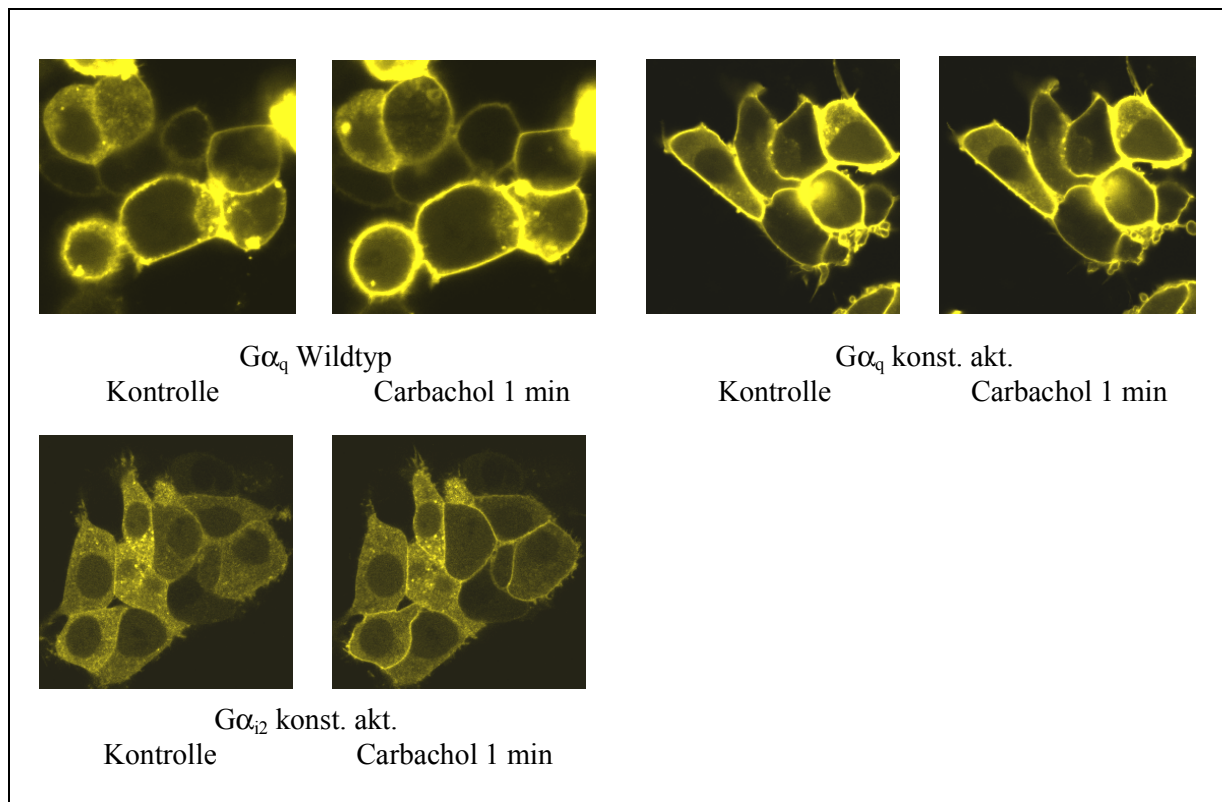


Abb. 32) $G\alpha_q$ -vermittelte Translokation der SphK1 zur Plasmamembran

Die den M_3 -Rezeptor stabil exprimierenden HEK-293-Zellen wurden mit SphK1-YFP und $G\alpha_q$ Wildtyp, konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ oder konstitutiv aktivem $G\alpha_{i2}$ (je 50 μg DNA pro 145 cm^2 -Kulturschale) co-transfiziert. Die Bildpaare (mit dem Laserscanning-Mikroskop aufgenommen) zeigen jeweils eine Gruppe von Zellen vor und nach der Stimulation mit Carbachol (100 μM).

4.4.6. Lokalisation der SphK1 vor und nach Stimulation mit Agonisten in PC12-Zellen

Um die Lokalisation und Translokation der SphK1 in einem weiteren Zelltyp zu untersuchen, wurden stabil mit SphK1 transfizierte PC12-Zellen verwendet. Die stabile Expression des Proteins hat den Vorteil, daß sich der Abbau und die Neusynthese des überexprimierten Proteins hier im Gleichgewicht befinden.

Wie in HEK-293-Zellen war die SphK1 auch in den stabil transfizierten PC12-Zellen im Cytosol und nicht im Kern lokalisiert (Abb. 33). Während jedoch in HEK-293-Zellen meist ein Teil der SphK1 an der Plasmamembran lokalisiert war (Abb. 16), war dies in PC12-Zellen nicht der Fall (Abb. 33).

Da in HEK-293-Zellen die Stimulation G_q -gekoppelter Rezeptoren und die Überexpression von konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ eine Translokation der SphK1 induzierte, sollte dies auch in PC12-Zellen untersucht werden. Eine Stimulation mit Bradykinin für eine oder fünf Minuten, was in HEK-293-Zellen eine Translokation induzierte (Abb. 21), hatte jedoch in PC12-Zellen keinen Einfluß auf die Lokalisation der SphK1 (Abb. 33).

Abb. 33:

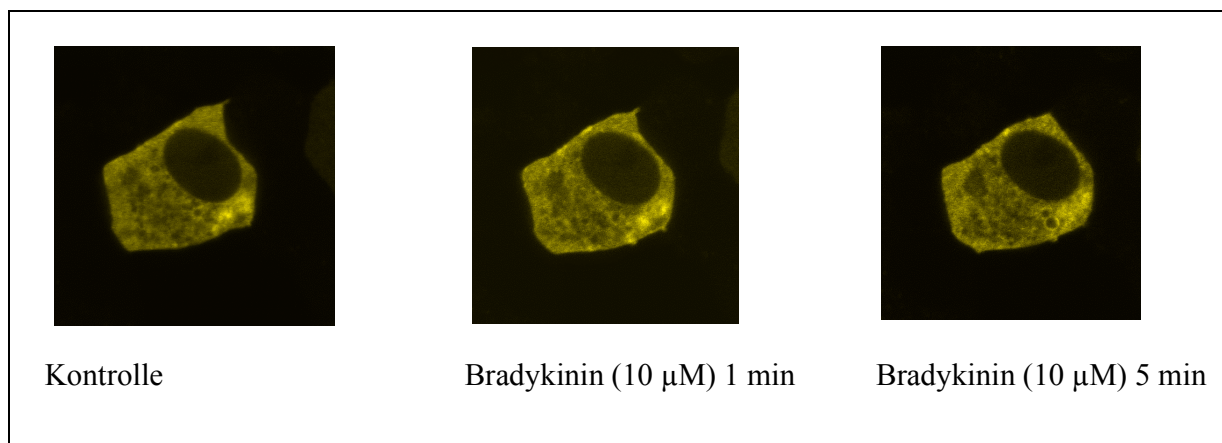


Abb. 33) Einfluß von Bradykinin auf die Lokalisation der SphK1 in PC12-Zellen

Die hier verwendeten PC12-Zellen exprimierten stabil die SphK1-YFP. Die Bildserie zeigt eine Zelle vor und nach der Stimulation mit Bradykinin. Die Bilder wurden mit dem Laserscanning-Mikroskop aufgenommen.

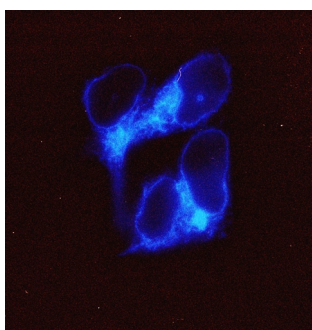
4.4.7. Vergleich der Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen mit dem ER und dem Golgi-Apparat

In *Saccharomyces cerevisiae* sind die Dihydrosphingosin phosphorylierenden Enzyme Lcb4p und Lcb5p am Golgi-Apparat lokalisiert. Die Phosphatasen befinden sich hingegen am ER (Hait *et al.*, 2002).

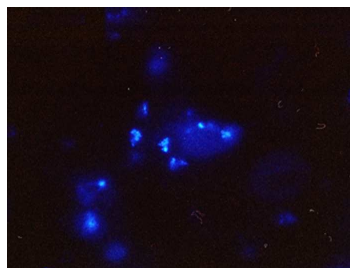
Wir konnten bislang zeigen, daß die SphK1 der Maus und die humane SphK2 in HEK-293-Zellen hauptsächlich im Cytosol lokalisiert sind. Nur ein kleiner Teil der SphK1 war gelegentlich an der Plasmamembran lokalisiert. Die SphK1 bildete dabei cytosolische Aggregate, die eine Assoziation des Enzyms mit intrazellulären Organellen vermuten ließ. Deshalb wurde untersucht, ob in HEK-293-Zellen die Sphingosinkinasen am ER oder Golgi-Apparat lokalisiert sind. Dazu wurden die Zellen mit Konstrukten des *cyan fluorescent proteins* (CFP) transfiziert, die mit Erkennungssequenzen für die Expression im ER oder im Golgi-Apparat gekoppelt waren (siehe 3.1.6.). Die Überexpression von ER-CFP und Golgi-CFP markiert folglich die genannten Organellen durch die Fluoreszenz des CFP.

Während das ER in HEK-293-Zellen ein feines Netzwerk innerhalb der gesamten Zelle bildete, fand sich der Golgi-Apparat eher in kleinen lokalisierten Regionen (Abb. 34). Die Lokalisation beider Sekretionsorganellen stimmte nicht mit der Lokalisation der SphK1 oder SphK2 überein (Abb. 34).

Abb. 34:



ER-CFP



Golgi-CFP

Abb. 34) Co-Lokalisation der Sphingosinkinasen mit verschiedenen Sekretionsorganellen

Die Zellen wurden mit ER-CFP oder Golgi-CFP transfiziert (je 50 µg DNA pro 145 cm²-Zellkulturschale). Die Bilder wurden am 3. Tag nach der Transfektion am Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

5. Diskussion

5.1. Einfluß von Sphingolipiden auf die Noradrenalin-Freisetzung in permeabilisierten PC12-Zellen

Vorausgegangene Arbeiten haben gezeigt, daß die Stimulation von PC12-Zellen mit Bradykinin oder ihre Depolarisation mit KCl nicht nur $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und die Freisetzung von Noradrenalin verursacht, sondern auch zu einer gesteigerten intrazellulären Bildung von S1P führt (Alemany *et al.*, 2001). Eine Hemmung der S1P-Produktion führte zur Hemmung der durch Bradykinin oder KCl induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung (Alemany *et al.*, 2001). Deshalb stellte sich die Frage, ob intrazelluläres S1P einen direkten Einfluß auf die Neurotransmitter-Exozytose haben könnte.

An intakten PC12-Zellen hatte extrazellulär zugefügtes S1P bei einer Konzentration, welche zu einer maximalen Aktivierung von S1P-GPCR führt, keinen Einfluß auf die Noradrenalin-Freisetzung. Auch SPC, welches bei höheren Konzentrationen als S1P die S1P-GPCR aktiviert (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002), hatte an intakten Zellen bei der maximal wirksamen Konzentration von 10 μ M keinen Einfluß auf die Noradrenalin-Freisetzung. Obwohl in PC12-Zellen über PCR mRNA für die S1P-GPCR EDG-3 und EDG-5 ermittelt worden war (van Brocklyn *et al.*, 1999), vermitteln diese Rezeptoren also nicht die Freisetzung von Neurotransmitter.

In permeabilisierten PC12-Zellen dagegen induzierte S1P die Noradrenalin-Freisetzung, während LPA und SPC inaktiv waren. Da diese Noradrenalin-Freisetzung nur an permeabilisierten, aber nicht an intakten Zellen beobachtet werden konnte, kann sie auf eine intrazelluläre Wirkung von S1P zurückgeführt werden. Außer S1P induzierte auch Sphingosin eine Noradrenalin-Freisetzung in permeabilisierten PC12-Zellen, wobei 10-20 μ M Sphingosin maximal wirksam waren und höhere Konzentrationen wieder unwirksam. Da Sphingosin in vielen Experimenten stärker wirksam war als S1P, scheint es unwahrscheinlich, daß Sphingosin zu S1P phosphoryliert wird und dann erst seine Wirkung ausübt.

Folgende Beobachtungen sprechen dafür, daß die Stimulation der Noradrenalin-Freisetzung durch intrazelluläres S1P und Sphingosin unabhängig von einem $[Ca^{2+}]$ -Anstieg erfolgt: Erstens wurde eventuell freigesetztes Ca^{2+} durch das im KG-Puffer enthaltene EGTA cheliiert. Zweitens ist bekannt, daß S1P in verschiedenen permeabilisierten Zellsystemen nicht in der Lage ist, Ca^{2+} zu mobilisieren, während SPC dies häufig tut (Kindman *et al.*, 1994; Yule *et al.*, 1993; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998b). SPC jedoch stimulierte bis zu

Konzentrationen von 100 μM , welche für die Ca^{2+} -Mobilisierung supramaximal sind (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998b), keine Noradrenalin-Freisetzung.

Insgesamt erreichten S1P und Sphingosin etwa die Hälfte der Wirkung von 10 μM freiem Ca^{2+} und waren folglich recht effizient. Zum ersten Mal wird hier gezeigt, daß Lysosphingolipide intrazellulär und Ca^{2+} -unabhängig die Neurotransmitter-Exozytose stimulieren können, obwohl der Mechanismus der beiden Lipide gegenwärtig unklar ist. Da diese Wirkung nicht auf S1P beschränkt war, sondern auch von Sphingosin vermittelt wurde, eignete sich dieses System jedoch nicht für die Identifizierung intrazellulärer Angriffspunkte von S1P.

5.2. Klonierung einer SphK2-Variante

Für nachfolgende funktionelle Untersuchungen stand zu Beginn der vorliegenden Arbeit eine der SphK2 sehr ähnliche humane Gensequenz in einem Klonierungsvektor zur Verfügung. Diese von Regina Alemany über PCR gewonnene Sequenz wurde in einen Expressionsvektor kloniert und auf ihre Expression getestet. Die Sequenz des Konstruktes war 3,11 kb lang und beinhaltete 2 ATG-Startcodons. Da die Expression dieser SphK2 in der Immunfärbung nicht nachgewiesen werden konnte, wurden über RT-PCR die überschüssigen N- und C-terminalen Enden entfernt und 2 separate SphK2-Varianten kloniert (SphK2_{lang} [2285 bp]; SphK2_{kurz} [1991 bp]). Im Westernblot konnte schließlich die Expression der SphK2_{kurz} nachgewiesen werden, jedoch nicht die Expression der SphK2_{lang}. Die Analyse des Proteins in der Datenbank (Swiss-Prot/TrEMBL; Prot Param Tool) ergab, daß es sich bei der SphK2_{lang} um ein instabiles Protein handeln könnte. Es ist beschrieben worden, daß die Stabilität eines Proteins durch die Aminosäurezusammensetzung des N-terminalen Endes bestimmt wird (Bachmair *et al.*, 1986; Ciechanover and Schwartz, 1989; Gonda *et al.*, 1989; Tobias *et al.*, 1991). Die Instabilität eines Proteins kann nach einer von Guruprasad *et al.* (1990) entwickelten Formel berechnet werden, wobei ein „*Instability Index*“ von < 40 ein Protein als stabil, und ein „*Instability Index*“ von > 40 ein Protein als instabil beschreibt. Der „*Instability Index*“ der SphK2_{gesamt} liegt bei 51.31, wobei der N-terminale Bereich zwischen dem 1. und 2. ATG-Startcodon einen „*Instability Index*“ von 69.73 aufweist. Dies könnte tatsächlich bedeuten, daß die SphK2_{lang} nach der Expression sehr schnell proteolytisch gespalten wird, so daß das Protein in der Immunanalyse nicht mehr nachweisbar wäre,

obwohl eine PCR mit cDNA aus humanen Zelllinien zeigte, daß die Gensequenz dieser SphK2 endogen exprimiert wird.

Für weitere Untersuchungen wurde daraufhin die SphK2_{kurz} verwendet. Dieses Protein unterscheidet sich lediglich im C-Terminus geringfügig von der von Liu et al. (2000) identifizierten SphK2. Dennoch konnte die hier gezeigte Sequenz vollständig auf dem humanen Chromosom 19 gefunden werden. Folglich handelt es sich bei der hier beschriebenen SphK2_{kurz} um eine neue SphK2-Variante.

Im Westernblot zeigten sich große Unterschiede in der Expression der Sphingosinkinasen SphK1 und SphK2. Von den pcDNA3-Konstrukten wurde die SphK1 gut exprimiert, die SphK2 jedoch deutlich schlechter. Daraufhin wurden die Sphingosinkinasen in einen weiteren Expressionsvektor umklontiert (pEYFP-C1). Durch diesen Vektor wird N-terminal das gelbe fluoreszierende Protein (YFP) an die Proteine gekoppelt. Interessanterweise wurde anscheinend die Stabilität der SphK2_{kurz} durch die Kopplung mit einem YFP-Protein am N-terminalen Ende erhöht, denn im Westernblot ließ sich deutlich mehr SphK2-YFP als SphK2 nachweisen, und bei Überexpression in HEK-293-Zellen hatte die SphK2-YFP eine höhere Aktivität als das nicht gekoppelte Protein.

5.3. Rolle der Sphingosinkinase-Isoformen bei der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege und Noradrenalin-Freisetzung

In HEK-293-Zellen sind Sphingosinkinasen an der Stimulation von $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen durch die Muskarinrezeptor-Subtypen M₂ und M₃ und durch endogene S1P-GPCR beteiligt (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a; 1999; 2001). In PC12-Zellen stimulieren die endogen exprimierten Bradykinin-Rezeptoren die S1P-Produktion, und das durch Sphingosinkinasen gebildete S1P ist an der Vermittlung der Bradykinin-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege beteiligt (Lass, 2000; Alemany *et al.*, 2001). Die S1P-Bildung kann in PC12-Zellen auch durch Depolarisierung mit KCl stimuliert werden und ist auch hier am Gesamt- $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg beteiligt (Alemany *et al.*, 2001). Es war jedoch nicht bekannt, welche Sphingosinkinase-Isoformen dabei eine Rolle spielen. Um den Einfluß der Sphingosinkinase-Isoformen auf die $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege untersuchen zu können, wurden SphK1 oder SphK2 in HEK-293- und PC12-Zellen überexprimiert.

Da die basale Aktivität der Sphingosinkinasen und insbesondere der SphK1 unabhängig von einer Agonisten-Stimulation sehr hoch ist, wurden für die Messungen jeweils

verschiedene Mengen an DNA transfiziert. Tatsächlich zeigten sich große Unterschiede je nach Menge der transfizierten DNA. Wurde in HEK-293-Zellen eine geringe Menge SphK1 überexprimiert, wurden die durch Carbachol (M_3 -Muskarinrezeptor) oder S1P (S1P-GPCR) induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege signifikant erhöht. Transfektion einer größeren Menge SphK1 führte jedoch zu einer Hemmung der durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Diese Wirkung könnte auf einer Verarmung der Zellen an Sphingosin beruhen, die nach Überexpression der SphK1 bereits von Olivera et al. (1999) beschrieben wurde. Entsprechend würde in den SphK1-überexprimierenden Zellen nicht genügend Sphingosin zur Verfügung stehen, um durch eine akute Stimulation einen für die Ca^{2+} -Mobilisierung erforderlichen Anstieg der S1P-Produktion zu erhalten. Eine andere Möglichkeit ist, daß die dauerhafte Stimulation durch chronische Erhöhung der zellulären S1P-Spiegel zu einem negativen Feedback bei der Ca^{2+} -Mobilisierung führt.

Die durch Carbachol induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden durch Expression höherer Mengen an SphK1 nicht beeinflusst, was daran liegen könnte, daß die durch den M_3 -Rezeptor induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege bei einer maximalen Stimulation mit Carbachol nicht von der Sphingosinkinase abhängig sind (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a). So wurden die durch Carbachol induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in M_3 -exprimierenden HEK-293-Zellen nicht durch Sphingosinkinase-Inhibitoren gehemmt (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a). Die durch S1P-GPCR induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege waren dagegen stark von der Sphingosinkinase abhängig (Meyer zu Heringdorf et al., 2001). Interessanterweise konnten jedoch auch die durch den M_3 -Rezeptor stimulierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch die Bereitstellung einer kleinen Menge SphK1 oder Erhöhung der basalen S1P-Spiegel verstärkt werden. Dennoch bleibt gegenwärtig unklar, ob die SphK1 tatsächlich an der Vermittlung von $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen durch M_3 -Rezeptoren oder S1P-GPCR beteiligt ist oder nur über eine Veränderung der zellulären S1P Spiegel wirkt.

In PC12-Zellen verursachte sowohl die transiente als auch die stabile Überexpression der SphK1 eine deutliche Verstärkung der durch KCl-Depolarisation induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Dagegen wurden die durch Bradykinin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege, ähnlich wie die durch Carbachol induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in HEK-293-Zellen, durch Überexpression einer größeren Menge von SphK1 nicht beeinflusst. Die durch KCl-Depolarisation induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege beruhen in ersten Linie auf einem Ca^{2+} -Einstrom durch Spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle und nicht primär, wie bei den GPCR, auf einer Ca^{2+} -Mobilisierung. Es ist jedoch bekannt, daß der durch Depolarisierung ausgelöste Ca^{2+} -Einstrom zur sekundären Aktivierung einer Ca^{2+} -Mobilisierung führen kann, die dann zum Gesamt- Ca^{2+} -Anstieg beiträgt. Dieser Prozeß wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung bezeichnet. So

einen Verstärkungsmechanismus könnte auch die SphK1 darstellen. Dieses Enzym enthält Bindungsstellen für Ca^{2+} /Calmodulin und könnte folglich durch Ca^{2+} aktiviert werden, obwohl dies bisher noch nicht direkt nachgewiesen werden konnte. Die durch SphK1 katalysierte S1P-Produktion könnte dann zur Ca^{2+} -Mobilisierung führen und so die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege erhöhen.

Die Verstärkung der KCl-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege durch SphK1-Expression spiegelte sich auch in einer Verstärkung der KCl-induzierten Noradrenalin-Freisetzung wieder. Sowohl in transient als auch in stabil transfizierten PC12-Zellen verstärkte die SphK1 die Noradrenalin-Freisetzung durch KCl-Depolarisation. Diese Verstärkung könnte sowohl auf der Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege als auch auf einer direkten Wirkung des intrazellulären S1P auf die Noradrenalin-Freisetzung beruhen, wie weiter oben (5.1.) dargestellt.

Die Überexpression der SphK2 verursachte in HEK-293-Zellen ähnlich wie die Überexpression der SphK1 eine Hemmung der durch S1P induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege, während die Carbachol (M_3 -Rezeptor)-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege weitgehend unbeeinflusst blieben. Dies könnte wiederum auf einer Sphingosin-Verarmung oder auf einem negativen Feedback-Mechanismus beruhen, wie oben dargestellt.

In PC12-Zellen verursachte die SphK2-Überexpression eine Verstärkung sowohl der durch KCl als auch der durch Bradykinin induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege. Entsprechend wurde durch die SphK2 auch die durch KCl oder Bradykinin induzierte Noradrenalin-Freisetzung erhöht. Dies Ergebnis legt eine Rolle der SphK2 sowohl bei der Wirkung von Bradykinin als auch bei der Depolarisation nahe. Die Daten wurden jedoch in stabil transfizierten Zellen gewonnen, die durch Selektion mit G418 aus einer geringen Zahl transfizierter Zellen hochgezogen worden waren. Deshalb ist nicht auszuschließen, daß der beobachtete Effekt der SphK2 auf einer Besonderheit der selektierten Zellen (z.B. mehr Bradykinin-Rezeptoren, mehr Ca^{2+} -Kanäle, größere Kapazität der Ca^{2+} -Speicher) beruhen könnte. Im Fall der SphK1-transfizierten Zellen werden die Daten durch Ergebnisse an transient transfizierten Zellen unterstützt, die sich eben nicht durch Selektionseffekte erklären lassen können. In den SphK2-transfizierten Zellen könnte jedoch auch die Menge an SphK2 gerade ausreichen, um noch keine Sphingosin-Verarmung zu erzeugen, aber eine Verstärkung S1P-abhängiger Zellprozesse zu induzieren.

Abb. 35:

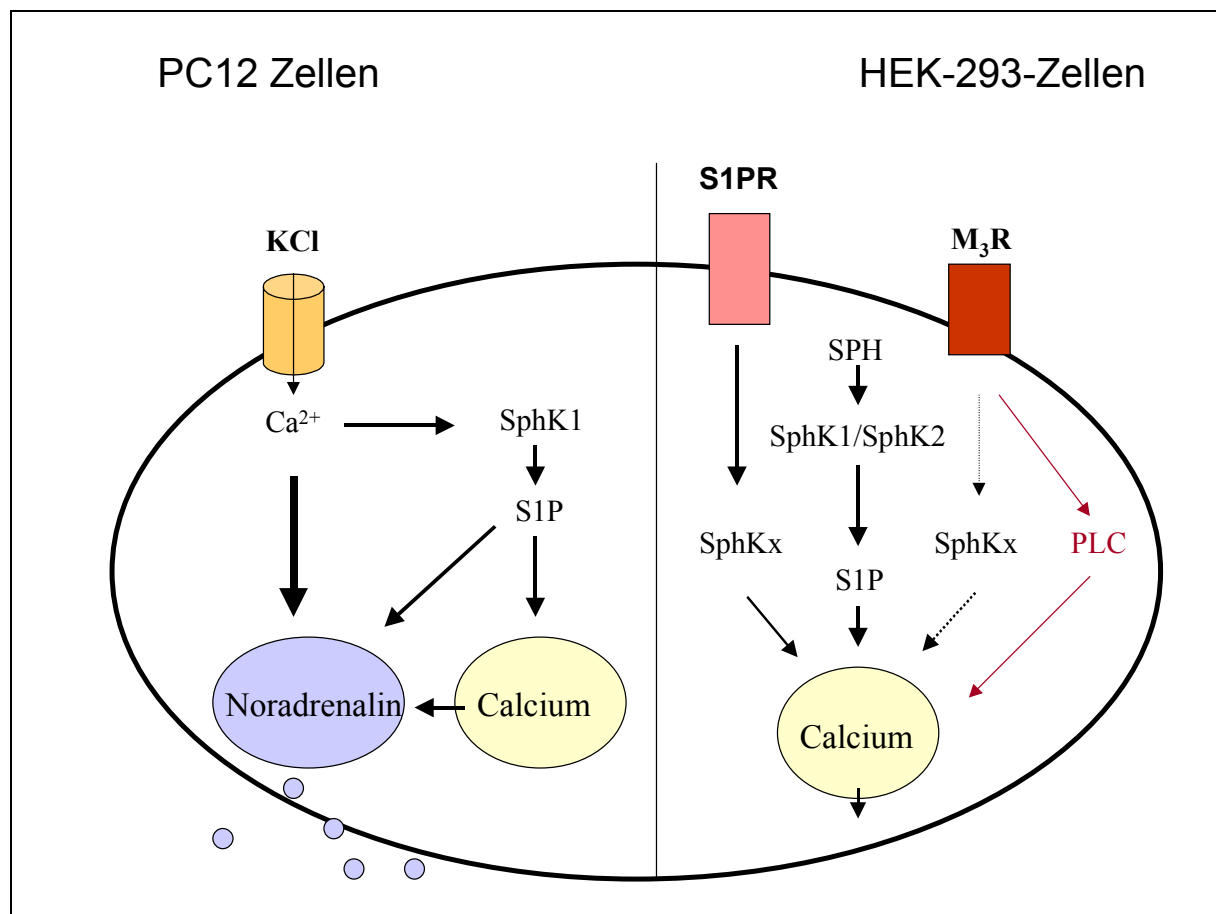


Abb. 35) Einfluß der Sphingosinkinase-Isoformen auf $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in PC12- und HEK-293-Zellen

5.4. Lokalisation und Translokation der Sphingosinkinase-Isoformen in HEK-293- und PC12-Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen zu untersuchen, wurden die mit dem YFP gekoppelten Sphingosinkinasen in HEK-293- und PC12-Zellen überexprimiert. In HEK-293-Zellen war die SphK1-YFP hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, gelegentlich fand sich ein Teil des Enzyms auch an der Plasmamembran. Diese Beobachtung stimmt damit überein, daß die SphK1 in HEK-293-Zellen eine cytosolische und eine membranassoziierte Aktivität aufweist (Kohama *et al.*, 1998). Die Gensequenz der SphK1 enthält keine membranspannenden Domänen (Kohama *et al.*, 1998), was vermutlich die Grundlage dafür ist, daß sich das Enzym zwischen Cytosol und Membran bewegen kann. Interessanterweise bildete die SphK1 im Cytosol Aggregate, was auch von Young *et al.* (2003) in SH-SY5Y-Zellen beobachtet und als Bildung von „hot spots“ beschrieben wurde. Die cytosolischen SphK1-Aggregate waren weder am ER noch am Golgi-Apparat lokalisiert. Hier ist ein Unterschied zwischen den Säuger-Sphingosinkinasen und den Sphingosinkinasen aus der Hefe festzustellen. Lcb4p und Lcb5p phosphorylieren DHS in *Saccharomyces cerevisiae*. Lcb4p ist am trans-Golgi-Netzwerk und den späten Endosomen lokalisiert und bewegt sich zwischen diesen beiden Kompartimenten (Hait *et al.*, 2002). Da es sich bei den Sphingosinkinasen um hochkonservierte Enzyme handelt, die vermutlich einen sehr frühen Ursprung in der Evolution haben, wäre es denkbar, daß die Bindung der Sphingosinkinasen an diese Organellen verloren gegangen ist.

Eine andere Arbeit zeigt die Co-Lokalisation von SphK1 mit RPK118 (Hayashi *et al.*, 2002). Die Interaktion von RPK118 mit SphK1 war im *yeast two-hybrid assay* festgestellt worden (Hayashi *et al.*, 2002). Funktionelle Untersuchungen ergaben, daß RPK118 keinen Einfluß auf die Sphingosinkinase-Aktivität hatte, jedoch zusammen mit SphK1 in kleinen Punkt- oder Ring-förmigen Strukturen lokalisiert war, die zum Teil als frühe Endosomen identifiziert werden konnten (Hayashi *et al.*, 2002). RPK118 könnte also eine Rolle bei der Regulation der SphK1-Lokalisation spielen. Ein anderes Protein, das an der Regulation der SphK1-Lokalisation beteiligt sein könnte, ist das dem AKAP (*protein kinase A anchoring protein*) verwandte Protein SKIP, daß ebenfalls durch *yeast two-hybrid screening* als SphK1-bindendes Protein identifiziert worden war (Lacana *et al.*, 2002). SKIP hatte einen hemmenden Einfluß auf die SphK1-Aktivität und war wie die SphK1 nach Überexpression in NIH 3T3-Fibroblasten im Cytosol lokalisiert (Lacana *et al.*, 2002).

Interessanterweise verstärkte der Calmodulin-Inhibitor W7 die Lokalisation der SphK1 im Cytosol. W7 verminderte die basale Membranlokalisation der SphK1 und verstärkte die cytosolische Aggregatbildung. Da die SphK1 Bindungsstellen für Ca^{2+} /Calmodulin enthält, ist anzunehmen, daß Calmodulin eine Rolle bei der Membranassoziation der SphK1 spielt.

Die SphK2-YFP war in HEK-293-Zellen ausschließlich im Cytosol zu finden, obwohl das Enzym mindestens vier hypothetische transmembranäre Domänen besitzt (Spiegel und Milstien, 2002). Wie die SphK1 war auch die SphK2 nicht im Zellkern lokalisiert. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigt, daß die SphK2 Zelltyp-spezifisch und je nach Zelldichte jedoch auch im Kern lokalisiert sein kann (Igarashi *et al.*, 2003). In HeLa-Zellen und in COS7-Zellen bei hoher Zelldichte war die SphK2 vorwiegend im Kern gelegen. In COS7-Zellen bei niedriger Zelldichte und in HEK-293-Zellen bei hoher oder niedriger Zelldichte fand sich die SphK2 jedoch vorwiegend im Cytosol (Igarashi *et al.*, 2003). Im Gegensatz zur SphK1 (siehe unten) änderte die SphK2 nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten in HEK-293-Zellen nicht ihre Lokalisation.

Die Stimulation von G_q -gekoppelten Rezeptoren (M_3 -Rezeptor mit Carbachol oder B_2 -Rezeptor mit Bradykinin) induzierte eine schnelle Translokation der SphK1-YFP zur Plasmamembran. Die Wirkung von Carbachol wurde durch Atropin blockiert, welches ein Antagonist an Muskarinrezeptoren ist, und wurde folglich tatsächlich durch den M_3 -Rezeptor vermittelt. Diese Translokation war bereits nach etwa 5 s bemerkbar und nach 30-60 s abgeschlossen. Rezeptoren, die hauptsächlich an G_i und weniger an G_q gekoppelt sind (z.B. S1P-GPCR oder M_2 -Rezeptoren), oder Rezeptor-Tyrosinkinasen (z.B. EGF- oder PDGF-Rezeptoren) induzierten keine SphK1-Translokation in HEK-293-Zellen, obwohl extrazelluläres S1P oder EGF oder eine Stimulation der M_2 -Rezeptoren in HEK-293-Zellen die S1P-Produktion stimulieren (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 1998a; 1999; 2001). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die genannten Rezeptoren die SphK1 oder eine andere Sphingosinkinase-Isoform aktivieren. Möglicherweise kann die SphK1 auch aktiviert werden, ohne ihre Lokalisation zu ändern.

Da also G_q -gekoppelte Rezeptoren die SphK1-Translokation in HEK-293-Zellen induzierten, wurde die Beteiligung verschiedener G-Proteine an diesem Vorgang untersucht. PTX hatte keinen Einfluß auf die M_3 -stimulierte SphK1-Translokation, G_i war also nicht daran beteiligt. Entsprechend hatte auch die Überexpression von konstitutiv aktivem $G\alpha_{i2}$

keinen Einfluß auf die SphK1-Lokalisation oder die M₃-stimulierte SphK1-Translokation. Konstitutiv aktives G α_q jedoch induzierte eine massive basale Translokation der SphK1 an die Plasmamembran, die von Carbachol nicht weiter verstärkt werden konnte. Der Signaltransduktionsweg, der die SphK1-Translokation vermittelt, verläuft also über G α_q .

Mit verschiedenen Stimuli und Inhibitoren wurde eine Beteiligung weiterer Signaltransduktionsmechanismen an der SphK1-Translokation untersucht. Die Aktivierung der PKC durch PMA oder eine Erhöhung der [Ca²⁺]_i durch Ionomycin oder Thapsigargin hatten keine Wirkung auf die SphK1-Lokalisation, obwohl diese Stimuli ebenfalls die S1P-Produktion in HEK-293-Zellen erhöhen (Alemany *et al.*, 2000; Lass, 2000). Die von Johnson *et al.* (2002) beobachtete SphK1-Translokation nach Stimulation mit PMA erfolgte wesentlich langsamer (30 min bis 1 h) als die hier beobachtete Translokation nach Stimulation mit Carbachol (Johnson *et al.*, 2002). Eine Vorinkubation der HEK-293-Zellen mit Ionomycin, Thapsigargin oder BAPTA/AM hatte keinen hemmenden Einfluß auf die durch Carbachol induzierte Translokation der SphK1-YFP. Nach der Vorinkubation mit diesen Substanzen ist Carbachol nicht mehr in der Lage, einen [Ca²⁺]_i-Anstieg zu induzieren, wobei gleichzeitig durch Ionomycin und Thapsigargin die [Ca²⁺]_i erhöht wird, durch Thapsigargin die Speicher entleert werden, und durch BAPTA die [Ca²⁺]_i niedrig gehalten wird. Folglich war die SphK1-Translokation unabhängig von Änderungen der [Ca²⁺]_i. Auch eine Vorinkubation mit dem PKC-Inhibitor Gö6976 oder dem Tyrosinkinase-Hemmstoff Genistein hatte keinen Einfluß auf die durch Carbachol induzierte SphK1-Translokation, die folglich unabhängig von einer PKC-Aktivierung oder Tyrosinphosphorylierung erfolgte. Die SphK1-Translokation war außerdem unabhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms, denn sie erfolgte auch nach Vorbehandlung mit DMS. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß die Aktivität der SphK1a mit DMS bis zu ca. 60 % gehemmt werden kann (Kohama *et al.*, 1998).

Die SphK1 kommt anscheinend nicht nur intrazellulär vor, sondern kann offensichtlich auch sezerniert werden kann (Ancellin *et al.*, 2002). Dabei wurde beschrieben, daß der Export der SphK1 durch eine Behandlung mit Cytochalasin D gehemmt werden konnte, was eine Beteiligung des Aktin-Cytoskeletts an der Sekretion nahe legte (Ancellin *et al.*, 2002). Hier konnte weder eine basale noch eine Carbachol-stimulierte Sekretion der SphK1 festgestellt werden (nicht gezeigt). Darüber hinaus war die M₃-stimulierte SphK1-Translokation unabhängig von der Architektur des Aktin-Cytoskeletts denn sie wurde durch Cytochalasin B nicht gehemmt.

Interessant war schließlich die Entdeckung, daß die Translokation der SphK1 zellspezifisch ist. In PC12-Zellen, welche endogen den B₂-Rezeptor exprimieren (Dendorfer

und Dominiak, 1995), löste die Stimulation mit Bradykinin keine Translokation der SphK1 aus. Dagegen war Bradykinin in mit dem B₂-Rezeptor transfizierten HEK-293-Zellen aktiv. Auch basal war die SphK1 in PC12-Zellen ausschließlich im Cytosol lokalisiert und nicht, wie in HEK-293-Zellen, zum Teil an der Membran zu finden. Möglicherweise fehlt in PC12-Zellen ein Protein, das die SphK1 an der Membran verankern könnte.

Zelltyp-spezifisch war auch der Einfluß von Ca²⁺ und Calmodulin auf die Lokalisation und die M₃-stimulierte Translokation der SphK1. In SH-SY5Y induzierte eine Stimulation des M₃-Rezeptors ähnlich wie in HEK-293-Zellen eine innerhalb von 5 min verlaufende Translokation der SphK1 vom Cytosol an die Plasmamembran (Young *et al.*, 2003). In SH-SY5Y-Zellen war diese Translokation jedoch anders reguliert als in HEK-293-Zellen. So konnte sie z.B. durch Thapsigargin stimuliert werden (Young *et al.*, 2003). Außerdem wurde die M₃-stimulierte SphK1-Translokation in SH-SY5Y-Zellen durch Vorbehandlung mit dem Calmodulin-Inhibitor W7 gehemmt und war folglich, anders als in HEK-293-Zellen, von Ca²⁺ und Calmodulin abhängig (Young *et al.*, 2003). In HEK-293-Zellen hatte jedoch Thapsigargin keinen Einfluß auf die SphK1-Lokalisation, und die Wirkung des M₃-Rezeptors war nicht von einem [Ca²⁺]_i-Anstieg abhängig (siehe oben). Obwohl W7 in HEK-293-Zellen die cytosolische Aggregatbildung der SphK1 verstärkte und den Anteil an membrangebundener SphK1 reduzierte, hemmte es hier nicht die Wirkung des M₃-Rezeptors. In HEK-293-Zellen steht dem M₃-Rezeptor also vermutlich ein nicht auf Ca²⁺/Calmodulin beruhender Mechanismus für die Membran-Assoziation der SphK1 zur Verfügung.

Abb. 36:

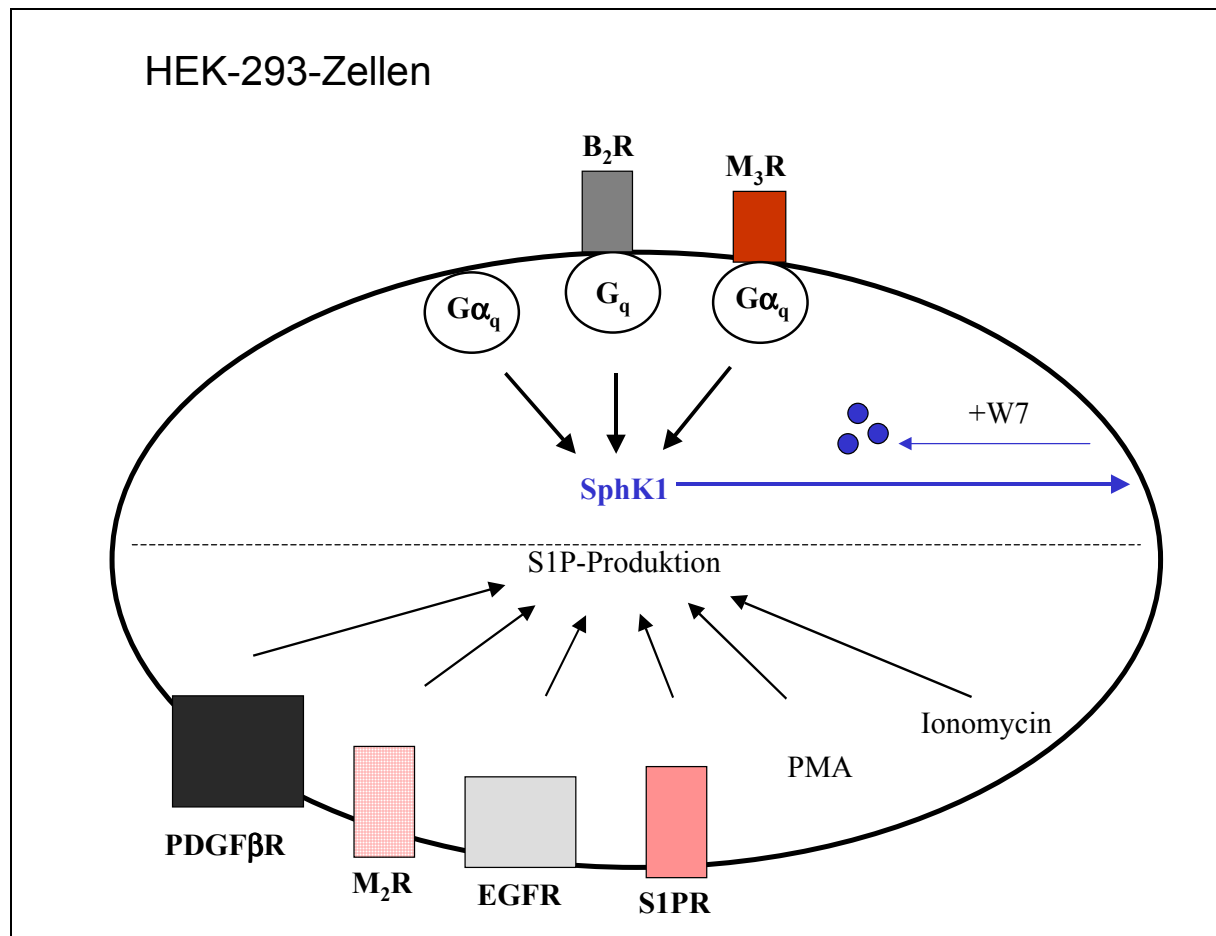


Abb. 36) Translokation der SphK1 in HEK-293-Zellen

6. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Lysolipide auf die Noradrenalin-Freisetzung an permeabilisierten PC12-Zellen untersucht. Während extrazelluläres S1P an intakten PC12-Zellen keine Wirkung hatte, induzierte S1P in permeabilisierten Zellen die Freisetzung von Noradrenalin. Außer S1P induzierte auch Sphingosin (10-20 μM) in permeabilisierten PC12-Zellen die Noradrenalin-Freisetzung, wohingegen LPA und SPC unwirksam waren. Die Wirkung von S1P und Sphingosin erreichte etwa die Hälfte der Wirkung von 10 μM freiem Ca^{2+} und war vermutlich unabhängig von einer Ca^{2+} -Mobilisierung. Hierbei handelt es sich um eine bisher nicht beschriebene intrazelluläre Aktivität von S1P und Sphingosin.

Im nächsten Teil der Arbeit wurde die Rolle der Sphingosinkinase-Isoformen SphK1 und SphK2 bei der Stimulation von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegen durch Membranrezeptoren untersucht. Dabei wurde zunächst eine der SphK2 sehr ähnliche humane Gensequenz, die von R. Alemany mit degenerierten Primern gewonnen und in einen Klonierungsvektor ligiert worden war, zur Expression gebracht und analysiert. Die Gensequenz besaß eine Länge von 3,11 kb, wobei der Leserahmen mit dem 1. Startcodon bei 709 bp begann und bei 2994 bp endete. Im gleichen Leserahmen befand sich an Position 1003 bp ein zweites ATG-Startcodon. Insgesamt wurden aus dieser Gensequenz zwei Konstrukte zur Expression in Säugerzellen erstellt: die SphK2_{lang} (2285 bp) begann mit dem 1. Startcodon und die SphK2_{kurz} (1991 bp) mit dem 2. Startcodon. Dabei unterschied sich die SphK2_{kurz} lediglich im C-Terminus von der zuvor beschriebenen SphK2. Die SphK2_{lang} stellte dagegen eine N-terminal erheblich verlängerte Variante der SphK2 dar. Nach einer Transfektion von Säugerzellen mit diesen Konstrukten konnte jedoch im Westernblot und in der Immunfärbung nur die Expression der SphK2_{kurz} nachgewiesen werden, obwohl über RT-PCR die endogene Expression der SphK2_{lang} in verschiedenen Zellen gezeigt werden konnte. Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab, daß es sich bei der SphK2_{lang} um ein instabiles Protein handeln könnte. Die SphK2_{kurz} ließ sich jedoch als Myc-gekoppeltes und als YFP-gekoppeltes Protein exprimieren. Wegen ihrer Ähnlichkeit zur vorher identifizierten SphK2 wurde die SphK2_{kurz} schließlich als SphK2 bezeichnet. Nach Überexpression in HEK-293-Zellen konnte die katalytische Aktivität der SphK2-YFP nachgewiesen werden.

Eine Überexpression der SphK1 in HEK-293-Zellen führte je nach Menge der transfizierten DNA zu einer Verstärkung oder Hemmung der Agonist-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege. Während eine kleine Menge SphK1 die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege durch Carbachol (M_3 -

Rezeptor) und S1P (S1P-GPCR) verstärkte, verursachte eine größere Menge SphK1 eine Hemmung vor allem der stark von der Sphingosinkinase abhängigen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch S1P-GPCR. Auch die Überexpression der SphK2 führte zur Hemmung der durch S1P induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Dies könnte auf einer Verarmung der Sphingosinkinase-überexprimierenden Zellen an Sphingosin beruhen, oder auch durch ein negatives Feedback durch chronisch erhöhte S1P-Produktion in den Zellen verursacht werden. In PC12-Zellen führte die transiente oder stabile Überexpression der SphK1 zu einer deutlichen Verstärkung der durch KCl-Depolarisation induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Dieser Effekt spiegelte sich auch in einer Verstärkung der durch KCl induzierten Noradrenalinfreisetzung durch SphK1-Überexpression wider. Da die SphK1 Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsstellen besitzt, könnte sie durch den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei der Depolarisation aktiviert werden und einen Verstärkungsmechanismus darstellen. Eine stabile Überexpression der SphK2 verursachte in PC12-Zellen eine Verstärkung der durch KCl-Depolarisation oder Bradykinin induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege. Insgesamt erlauben diese Ergebnisse jedoch gegenwärtig nicht die Schlussfolgerung, welche Sphingosinkinase-Isoform von welchem Rezeptor für die Induktion von $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen verwendet wird, denn es ist nicht bekannt, welche Wirkung chronisch erhöhte S1P-Spiegel oder chronisch erniedrigte Sphingosin-Spiegel dabei spielen. Nicht durch Überexpression, sondern durch genetische Ausschaltung der Sphingosinkinase-Isoformen wird sich ihre jeweilige Rolle schließlich feststellen lassen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation der YFP-gekoppelten Sphingosinkinase-Isoformen in lebenden HEK-293- und PC12-Zellen vor und nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die SphK2 in HEK-293-Zellen nur im Cytosol vorkommt und auch nach Stimulation der Zellen ihre Lokalisation nicht verändert. Die SphK1 befand sich in HEK-293-Zellen hauptsächlich im Cytosol, nur ein kleiner Teil war in unstimulierten Zellen an der Plasmamembran lokalisiert. Eine Stimulation der HEK-293-Zellen mit Carbachol verursachte eine rasche, innerhalb von Sekunden verlaufende Translokation der SphK1 vom Cytosol an die Plasmamembran. Diese Wirkung wurde auch nach Stimulation des B_2 -Rezeptors beobachtet, jedoch nicht nach Stimulation von M_2 -, S1P-, Thrombin-, EGF- oder PDGF-Rezeptoren. In PC12-Zellen hatte Bradykinin dagegen keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation der SphK1, die folglich Zelltyp-spezifisch war.

Die durch den M_3 -Rezeptor induzierte SphK1-Translokation war unabhängig von einem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg, einer Entleerung der Ca^{2+} -Speicher, einer PKC-Aktivierung, einer Tyrosinphosphorylierung, vom Aktin-Cytoskelett und von der katalytischen Aktivität der

SphK1. Der Calmodulin-Inhibitor W7 verursachte eine Rückverlagerung von basal an der Membran gebundener SphK1 ins Cytosol und eine Verstärkung der cytosolischen SphK1-Aggregate, was für eine Rolle von Ca^{2+} /Calmodulin bei der Membran-Assoziation der SphK1 spricht. W7 vermochte nicht die M_3 -stimulierte SphK1-Translokation zu hemmen, was nahe legt, daß hier ein anderer Mechanismus zur Membran-Assoziation des Enzyms führte. Schließlich konnte gezeigt werden, daß die M_3 -stimulierte SphK1-Translokation auf der Aktivierung von $\text{G}\alpha_q$ beruhte und durch konstitutiv aktives $\text{G}\alpha_q$ spezifisch imitiert werden konnte. Die Daten zeigen, daß die subzelluläre Lokalisation der SphK1 Zelltyp-spezifisch durch verschiedene Stimuli reguliert wird, und legen eine Rolle dieses Enzyms bei der lokalen Produktion von S1P in der Zelle nahe.

7. Literaturverzeichnis

- Alemaný, R., Meyer zu Heringdorf, D., van Koppen, C. J., Jakobs, K. H. (1999) Formyl peptide receptor signaling in HL-60 cells through sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 274, 3994-3999
- Alemaný, R., Kleuser, B., Ruwisch, L., Danneberg, K., Lass, H., Hashemi, R., Spiegel, S., Jakobs, K. H., Meyer zu Heringdorf, D. (2001) Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett.* 509, 239-244
- An, S., Zheng, Y., Bleu, T. (2000) Sphingosine-1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg-3 and Edg-5. *J. Biol. Chem.* 275, 288-296
- Ancellin, N., Colmont, C., Su, J., Li, Q., Mittereder, N., Chae, S. S., Stefansson, S., Liao, G., Hla, T. (2002) Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation. *J. Biol. Chem.* 277, 6667-6675
- Ahnert-Hilger, G., Weller, U. (1993) Comparison of the intracellular effects of clostridial neurotoxin on exocytosis from streptolysin O-permeabilized rat pheochromocytoma (PC12) and bovine adrenal chromaffin cel. *Neuroscience* 53, 547-552
- Asubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1989) Current protocols in molecular biology. *John Wiley & sons*, New York
- Bachmaier, A., Finley, D., Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979) A rapid and alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513
- Bornfeldt, K. E., Graves, L. M., Raines, E. W., Igarashi, Y., Wayman, G., Yamamura, S., Yatomi, Y., Sidhu, J. S., Krebs, E. G., Hakomori, S., Ross, R. (1995) Sphingosine-1-phosphate inhibits PDGF-induced chemotaxis of human arterial smooth muscle cells: spatial and temporal modulation of PDGF chemotactic signal transduction. *J. Cell Biol.* 130, 193-206

- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Buehrer, B. M., Bell, R. M. (1992) Inhibition of sphingosine kinase in vitro and in platelets. *J. Biol. Chem.* 267, 3154-3159
- Buehrer, B. M., Bardes, E. S., Bell, R. M. (1996) Protein kinase C-dependent regulation of human erythroleukemia (HEL) cell sphingosine kinase activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1303, 233-242
- Choi, O. H., Kim, J.-H., Kinet, J.-P. (1996) Calcium mobilization via sphingosine kinase in signalling by the Fcε RI antigen receptor. *Nature* 380, 634-636
- Ciechanover, A., Schwartz, A. L. (1989) How are substrates by the ubiquitin-mediated proteolytic system? *Trends Biochem. Sci.* 14, 483-488
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P. G., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Spiegel, S. (1996) Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800-803
- Cuvillier, O., Rosenthal, D. S., Smulson, M. E., Spiegel, S. (1998) Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 2910-2916
- Dendorfer, A. und Dominiak, P. (1995) Characterization of bradykinin receptors mediating catecholamine release in PC12 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351, 274-281
- Edsall, L. C., Pirianov, G. G., Spiegel, S. (1997) Involvement of sphingosine-1-phosphate in nerve growth factor mediated neuronal survival and differentiation. *J. Neurosci.* 17, 6952-6960
- Edsall, L. C., Van Brocklyn, J. R., Cuvillier, O., Kleuser, B., Spiegel, S. (1998) *N,N*-Dimethylsphingosine is a potent competitive inhibitor of sphingosine kinase but not of protein kinase C: Modulation of cellular levels of sphingosine-1-phosphate and ceramide. *Biochemistry* 37, 12892-12898
- English, D., Kovala, A. T., Welch, Z., Harvey, K. A., Siddiqui, R. A., Brindle Carcia, J. G. (1999) Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization

- of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J. Hematother Stem. Cell Res.* 8, 627-34
- English, D., Brindley, D. N., Spiegel, S., Garcia, J. G. (2002) Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate. *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 228-239
- Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J. A., Weiner, J. A., Chun, J. (2001) Lysophospholipid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 507-534
- Ghosh, T. K., Bian, J., Gill, D. L. (1994) Sphingosine-1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium. *J. Biol. Chem.* 269, 22628-22635
- Gonda, D. K., Bachmair, A., Wunning, I., Tobias, J. W., Lane, W. S., Varsha, A. (1989) Universality and structure of the N-end rule. *J. Biol. Chem.* 264, 16700-16712
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450
- Hait, N. C., Fujita, K., Lester, R. L., Dickson, R. C. (2002) Lcb4p sphingoid base kinase localizes to the golgi and late endosomes *FEBS Lett.* 532, 97-102
- Hayashi, S., Okada, T., Igarashi, N., Fujita, T., Jahangeer, S., Nakamura, S. I. (2002) Identification and characterization of RPK118, a novel sphingosine kinase-1-binding protein. *J. Biol. Chem.* 277, 33319-33324
- Hla, T., Lee, M.-J., Ancellin, N., Liu, C. H., Thangada, S., Thompson, B. D., Kluk, M. (1999) Sphingosine-1-phosphate: Extracellular mediator or intracellular second messenger? *Biochem. Pharmacol.* 58, 201-207
- Hla, T., Lee, M.-J., Ancellin, N., Paik, J. H., Kluk, M. J. (2001) Lysophospholipids - receptor revelations. *Science* 294, 1875-1878
- Hla, T. (2003) Signalling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacological Res.* 47, 401-407
- Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Barak, L. S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M. G., Milstien, S., Spiegel, S. (2001) Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800-1803

- Hong, G., Baudhuin, L. M., Xu, Y. (1999) Sphingosine-1-phosphate modulates growth and adhesion of ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 460, 513-518
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., Nakamura, S. (2003) Sphingosine kinase 2 is a nuclear protein and inhibits DNA synthesis. *Biochem. Mol. Biol.* In press
- Johnson, K. R., Becker, K. P., Facchinetti, M. M., Hannun, Y. A., Obeid, L. M. (2002) PKC dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 277, 35257-35262
- Kindman, L. A., Kim, S., McDonald, T. V., Gardner, P. (1994) Characterization of a novel intracellular sphingolipid-gated Ca^{2+} -permeable channel from rat basophilic leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 269, 13088-13091
- Kleuser, B., Cuvillier, O., Spiegel, S. (1998) 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits programmed cell in HL-60 cells by activation of sphingosine kinase. *Cancer Res.* 58, 1817-1824
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M. M., Dickson, R., Spiegel, S. (1998) Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 23722-23728
- Lacana, E., Maceyka, M., Milstien, S., Spiegel, S. (2002) Cloning and characterization of an AKAP related protein that interacts with and regulates sphingosine kinase 1 activity. *Biochem. Mol. Biol.* 277, 32947-32953
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lass, H. (2000) Bedeutung der Sphingosinkinase für die Rezeptor-induzierte Calciummobilisierung. Dissertation
- Lee, M.-J., Van Brocklyn, J. R., Thangada, S., Liu, C. H., Hand, A. R., Menzeleev, R., Spiegel, S., Hla, T. (1998) Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science* 279, 1552-1555

- Lee, M.-J., Thangada, S., Claffey, K. P., Ancellin, N., Liu, C. H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R. I., Hla, T. (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301-312
- Lee, M. J., Thangada, S., Paik, J. H., Sapkota, G. P., Ancellin, N., Chae, S. S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C., Alessi, D. R., Hla, T. (2001) Akt-mediated phosphorylation of the G-protein-coupled receptor Edg-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell* 8, 693-704
- Liu, H., Sugiura, M., Nava, V. E., Edsall, L. C., Kono, K., Poulton, S., Milstien, S., Kohama, T., Spiegel, S. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *J. Biol. Chem.* 275, 19513-19520
- Liu, H., Toman, R. E., Goparaju, S., Maceyka, M., Nava, V. E. (2003) Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *Biochem. Mol. Bio.* (im Druck)
- Mc Lennan, A. J., Marks, L., Gaskin, A. A., Lee, N. (1997) Embryonic expression pattern of H218, a G-protein couple receptor homolog, suggests roles in early mammalian nervo system development. *Neuroscience* 79, 217-24
- Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., Wallach, D. (1997) MAP3K- related kinase involved in NF-kappa B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 385, 540-544
- Mandala, S. M., Thornton, R., Galve-Roperh, I., Poulton, S., Peterson, C., Olivera, A., Bergstrom, J., Kurtz, M. B., Spiegel, S. (2000) Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. *PNAS* 97, 7859-7864
- Manggau, M., Kim, D. S., Ruwisch, L., Vogler, R., Korting, H. C., Schäfer-Korting, M., Kleuser, B. (2001) 1Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 protects human keratinocytes from apoptosis by the formation of sphingosine-1-phosphate. *J. Invest Dermatol.* 117, 1241-1249
- Mattie, M. E., Brooker, G., Spiegel, S. (1996) Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 3181-3188

Melendez, A., Floto, R. A., Gilloly, D. J., Harnett, M. M., Allen, J. M. (1998) FcγRI coupling to phospholipase D initiates sphingosine kinase-mediated calcium mobilization and vesicular trafficking. *J. Biol. Chem.* 273, 9393-9402

Melendez, A., Carlos-Dias, E., Gosink, M., Allen, J. M., Takacs, L. (2000) Human sphingosine kinase: molecular cloning, functional characterization and tissue distribution. *Gene* 251, 19-26

Melendez, A., Khaw, K. A., (2002) Dichotomy of Ca²⁺ signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. *J. Biol. Chem.* 10, 17255-17262

Meyer zu Heringdorf, D., van Koppen, C. J., Windorfer, B., Himmel, H. M., Jakobs, K. H. (1996) Calcium signalling by G protein-coupled sphingolipid receptors in bovine aortic endothelial cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 354, 397-403

Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Alemany, R., Laser, K. T., Neumann, E., Zhang, C., Schmidt, M., Rauen, U., Jakobs, K. H., van Koppen, C. J. (1998a) Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 17, 2830-2837

Meyer zu Heringdorf, D., Niederdräing, N., Neumann, E., Fröde, R., Lass, H., van Koppen, C. J., Jakobs, K. H. (1998b) Discrimination between plasma membrane and intracellular target sites of sphingosylphosphorylcholine. *Eur. J. Pharmacol.* 354, 113-122

Meyer zu Heringdorf, D., Lass, H., Kuchar, I., Alemany, R., Guo, Y., Schmidt, M., Jakobs, K. H. (1999) Role of sphingosine kinase in Ca²⁺ signalling by epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* 461, 217-222

Meyer zu Heringdorf, D., van Koppen, C. J., Jakobs, K. H. (1999) Signal transduction by sphingosine kinase. In *Signal Transduction, A Practical Approach* (Milligan, G., ed) pp. 321-336, Oxford University Press.

Meyer zu Heringdorf, D., Vincent M.E.M., Lipinski, M., Danneberg, K., Stropp, U., Wang, D. A., Tigyi, G., Jakobs, K. H. Inhibitory calcium signaling by the sphingosine-1-phosphate receptor S1P₁. *Cellular Signalling* . (2002) *Cell. Signal.* 15, 677-687

- Nagiec, M. M., Skrzypek, M., Nagiec, E. E., Lester, R. L., Dickson, R. C. (1998) The LCB4 (YOR171c) and LCB5 (YLR260w) genes of *Saccharomyces* encode sphingoid long chain base kinases. *J. Biol. Chem.* 273, 19437-19442
- Nava, V. E., Lacana, E., Poulton, S., Liu, H., Sugiura, M., Kono, K., Milstien, S., Kohama, T., Spiegel, S. (2000) Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett.* 473, 81-84
- Ng, C. K. Y., Carr, K., McAinsh, M. R., Powell, B., Hetherington, A. M. (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410, 596-599
- Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H., Takuwa, Y. (2000) Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor Edg-5 but not Edg-1 or Edg-3. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9247-9261
- Olivera, A., Spiegel, S. (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365, 557-560
- Olivera, A., Rosenthal, J., Spiegel, S. (1996) Effect of acidic phospholipids on sphingosine kinase. *J. Cell. Biochem.* 60, 529-537
- Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstien, S., Spiegel, S. (1998) Purification and characterization of rat kidney sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 12576-12583
- Pyne, S., Pyne, N. J. (2002) Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 121-131
- Payne, S. G., Milstien, S., Spiegel, S. (2002) Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett.* 531, 54-57
- Pitson, S. M., D'Andrea, R. J., Vandeleur, L., Moretti, P. A. B., Xia, P., Gamble, J. R. (2000) Human sphingosine kinase: purification, molecular cloning and characterization of the native and recombinant enzymes. *Biochem. J.* 350, 429-441
- Pyne, S., Pyne, N. (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling via the endothelial differentiation gene family of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 88, 115-131

- Prieschl, E. E., Csonga, R., Novotny, V., Kikuchi, G. E., Baumruker, T. (1999) The balance between sphingosine and sphingosine-1-phosphate is decisive for mast cell activation after Fc epsilon receptor triggering. *J. Exp. Med.* 190, 1-8
- Rius, R. A., Edsall, L. C., Spiegel, S. (1997) Activation of sphingosine kinase in pheochromocytoma PC12 neuronal cells in response to trophic factors. *FEBS Lett.* 417, 173-176
- Sambook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory*, Cold Spring Harbour, New York
- Schmidt, M., Hüwe, S. M., Fasselt, B., Homann, D., Rümenapp, U., Sandmann, J., Jakobs, K. H. (1994) Mechanisms of phospholipase D stimulation by m3 muscarinic acetylcholine receptors evidence for involvement of tyrosine phosphorylation. *FEBS Lett.* 225, 667-675
- Schmidt, M., Bienek, C., van Koppen, C. J., Michel, M., Jakobs, K. H. (1995) Differential calcium signalling by m2 and m3 muscarinic acetylcholine receptors in a single cell type *Arch. Pharmacol* 352, 469-476
- Schmidt, M., Oude Weernink, P. A., vom Dorp, F., Stope, M. B., Jakobs, K. H. (2003) Mammalian Phospholipase C. Review in press
- Spiegel, S., Milstien, S. (2000) Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1484, 107-116
- Spiegel, S., Milstien, S. (2000) Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett.* 476, 55-57
- Spiegel, S., Milstien, S. (2002) Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule. *J. Biol. Chem.* 277, 25851-25854
- Spiegel, S., Milstien, S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Mol. Cell Biol.* 4, 397-407
- Stehlik, C., Martin, R. de, Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., Li (1998) Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-link iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188, 211-216

- Tobias, J. W., Shrader, T. E., Rocap, G., Varshavsky, A. (1991) The end rule in bacteria. *Science* 254, 1374-1377
- Van Brocklyn, J. R., Lee, M.-J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D. M., Coopman, P. J. P., Thangada, S., Liu, C. H., Hla, T., Spiegel, S. (1998) Dual actions of sphingosine-1-phosphate: Extracellular through the G_i-coupled receptor Edg--1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell Biol.* 142, 229-240
- Van Brocklyn, J. R., Tu, Z., Edsall, L., Schmidt, R. R., Spiegel, S. (1999) Sphingosine 1-phosphate-induced cell rounding and neurite retraction mediated by the G protein-coupled receptor H218. *J. Biol. Chem.* 274, 4626-4632
- Vann, L. R., Payne, S. G., Edsall, L. C., Twitty, S., Spiegel, S., Milstien, S. (2002) Involvement of sphingosine kinase in TNF- α -stimulated tetrahydrobiopterin biosynthesis in C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 12649-12656
- Van Veldhoven, P. P., Mannaerts, G. P. (1991) Subcellular localization and membrane topology of sphingosine 1-phosphat lyase in rat liver. *J. Biol. Chem.* 266, 12502-7
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., Baldwin, A. S. Jr. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAFc-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680-1683
- Wang, F., Van Brocklyn, J. R., Hobson, J. P., Movafagh, S., Zukowska-Grojec, Z., Milstien, S., Spiegel, S. (1999) Sphingosine-1-phosphate stimulates cell migration through a G_i-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 274, 35343-35350
- Xia, P., Gamble, J. R., Rye, K.-A., Wang, L., Hii, C. S. T., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A. G., Barter, P. J., Vadas, M. A. (1998) Tumor necrosis factor- α induces adhesion molecule expression through the sphingosine kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14196-14201
- Xia, P., Vadas, M. A., Rye, K.-A., Barter, P. J., Gamble, J. R. (1999) High density lipoproteins (HDL) interrupt the sphingosine kinase signaling pathway. A possible mechanism for protection against atherosclerosis by HDL. *J. Biol. Chem.* 274, 33143-33147

- Xia, P., Wang, L., Gamble, J. R., Vadas, M. A. (1999) Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor- α inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274, 34499-34505
- Xia, P., Gamble, J. R., Wang, L., Pitson, S. M., Moretti, P. A. B., Wattenberg, B. W., D'Andrea, R. J., Vadas, M. A. (2000) An oncogenic role of sphingosine kinase. *Curr. Biol.* 10, 1527-1530
- Young, K. W., Bootman, M. D., Channing, D. R., Lipp, P., Maycox, P. R., Meakin, J., Challiss, R. A. J., Nahorski, S. R. (2000) Lysophosphatidic acid-induced Ca^{2+} mobilization requires intracellular sphingosine-1-phosphate production. Potential involvement of endogenous Edg-4 receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 38532-38539
- Young, K. W., Nahorski, S. R. (2001) Intracellular sphingosine 1-phosphate production: a novel pathway for Ca^{2+} release. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 19-25
- Young, K. W., Nahorski, S. R. (2002) Sphingosine 1-phosphate: a Ca^{2+} release mediator in the balance. *Cell Calcium* 32, 335-341
- Young, K. W., Willets, J. M., Parkinson, M. J., Bartlett, P., Spiegel, S., Nahorski, S. R., Challiss, R. A. J. (2003) Ca^{2+} /Calmodulin-dependent translocation of sphingosine kinase: role in plasma membrane relocation but not activation. *Cell Calcium* 33, 119-128
- Yule, D. I., Wu, D., Essington, T. E., Shayman, J. A., Williams, J. A. (1993) Sphingosine metabolism induces Ca^{2+} oscillations in rat pancreatic acinar cells. *J. Biol. Chem.* 268, 12353-12358
- Zondag, G. C. M., Postma, F. R., van Etten, I., Verlaan, I., Moolenaar, W. H. (1998) Sphingosine-1-phosphate signalling through the G protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem. J.* 330, 605-609

8. Anhang: Eigene Publikationen

Originalarbeiten:

Alemaný, R., Kleuser, B., Ruwisch, L., Danneberg, K., Lass, H., Hashemi, R., Spiegel, S., Jakobs, K. H., Meyer zu Heringdorf, D. (2001) Depolarisation induces rapid and transient formation of intracellular sphingosine-1-phosphate. *FEBS Lett.* 509, 239-244.

Meyer zu Heringdorf, D., Vincent, M. E. M., Lipinski, M., Danneberg, K., Stropp, U., Wang, D., Tigyi, G., Jakobs, K. H. (2003) Inhibition of Ca^{2+} signalling by the sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁. *Cell. Signal.* 15, 677-687.

Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J. H., Tigyi, G., Jakobs, K. H. Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca^{2+} mobilization independently of G protein-coupled receptors. (im Druck)

Abstract:

Danneberg, K., Lipinski, M., Vincent, M., Schwindenhammer, Y., Manegold, R., Stropp, U., Jakobs, K. H., Meyer zu Heringdorf, D. (2002) Inhibitory calcium signalling by overexpressed S1P₁/Edg-1 receptor in HEK-293 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 365 Suppl., R21.

Danksagung:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Heinz Jakobs für die Überlassung des Themas und für die Aufnahme in seiner Abteilung, sowie Frau Dr. Dagmar Meyer zu Heringdorf für die kompetente fachliche Unterstützung während meiner Arbeit.

Für die Mitarbeit, an den in der Arbeit vorgekommenen Versuchsreihen, danke ich Frau Ellen Schäfer und Frau Tanja Hinz. Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Frau Claudia Moorkamp, die einen großen Teil der hervorragenden LSM-Bilder angefertigt hat.

Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Pharmakologie für die vielen Hilfestellungen und die unzähligen guten Ratschläge.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Funktionelle Rolle und subzelluläre Lokalisation der Sphingosinkinase-Isoformen 1 und 2 in HEK-293- und PC12-Zellen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Kerstin Danneberg befürworte.

Essen, 10. Oktober 2003

(Prof. Dr. K. H. Jakobs)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 10. Oktober 2003

(Kerstin Danneberg)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 10. Oktober 2003

(Kerstin Danneberg)

